

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Xenopus laevis İRİBAŞLARINA THİAKLOPRİD VE
TRİFLOKSİSTROBİN'İN AKUT TOKSİK ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI

MİRAÇ UÇKUN

DOKTORA TEZİ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

MALATYA
ARALIK 2013

Tezin Başlığı: *Xenopus laevis* İRİBAŞLARINA THİAKLOPRİD VE TRİFLOKSİSTROBİN'İN AKUT TOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Tezi Hazırlayan: **Miraç UÇKUN**

Sınav Tarihi: **06.12.2013**

Yukarıda adı geçen tez jürimizce değerlendirilerek Biyoloji Ana Bilim Dalında Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Sınav Jürisi Üyeleri:

Tez Danışman: Prof. Dr. Murat ÖZMEN
İnönü Üniversitesi



Prof. Dr. Dürdane KOLANKAYA
Hacettepe Üniversitesi



Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA
İnönü Üniversitesi



Yrd. Doç. Dr. Didem GÖKÇE
İnönü Üniversitesi



Doç. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ
İnönü Üniversitesi



Prof. Dr. Mehmet ALPASLAN
Enstitü Müdürü

ONUR SÖZÜ

Doktora Tezi olarak sunduđum “*Xenopus laevis* İribařlarına Thiaklopid ve Trifloksistrobin’in Akut Toksik Etkilerinin Arařtırılması” bařlıklı bu çalıřmanın bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı dűőecek bir yardıma bařvurmaksızın tarafımdan yazıldıđını ve yararlandıđım bűtűn kaynakların hem metin içinde hem de kaynakçada yűntemine uygun biçimde gűsterilenlerden oluřtuđunu belirtir, bunu onurumla dođrularım.


Miraç UÇKUN

ÖZET
Doktora Tezi

Xenopus laevis İRİBAŞLARINA THİAKLOPRİD VE TRİFLOKSİSTROBİN'İN
AKUT TOKSİK ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Miraç UÇKUN

İnönü Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı
163 + xi sayfa

2013

Danışman: Prof. Dr. Murat ÖZMEN

Dünyada en fazla kullanılan tarımsal mücadele yöntemleri, kimyasal yöntemlerdir. Kimyasal mücadelenin temelinde pestisit olan sentetik zirai maddeler vardır. Bu çalışmada *Xenopus laevis*'in (Afrika Peçeli Kurbağası) erken gelişim evrelerinde neonikotinoid grubu insektisitlerden thiakloprid, strobilurin grubu fungusitlerden trifloksistrobin'in ticari formlarının ve bunların karışımlarının toksik etkilerinin çeşitli biyokimyasal belirteçler kullanılarak değerlendirilmesi amaçlanmıştır. 96 saatlik test sonucunda thiakloprid ve trifloksistrobinin ortalama öldürücü konsantrasyon (LC_{50}) değerleri, sırasıyla 13.41 mg AI/L ve 0.09 mg AI/L olarak tespit edildi. Seçilen pestisitlerin uygulama konsantrasyonları 96 saatlik LC_{50} değerlerine göre belirlendi. 50-58. evredeki *Xenopus laevis* iribaşları, thiakloprid ve trifloksistrobinin ayrı ayrı LC_{50} , $LC_{50}/2$, $LC_{50}/10$, $LC_{50}/20$, $LC_{50}/50$ ve $LC_{50}/100$ konsantrasyonlarına ve bu konsantrasyonların ikili karışımlarına (1:1) 96 saatlik statik yenilemeli test sisteminde maruz bırakıldı. Bunun dışında, pestisitlerin 96 saatlik LC_{50} , $LC_{50}/2$, $LC_{50}/10$, $LC_{50}/20$, $LC_{50}/50$ ve $LC_{50}/100$ değerleri karışımlarına 24 saat süresince maruz bırakıldılar. Ayrıca, amfibi iribaşlarında pestisitlerin etkisi, glutatyon S-transferaz (GST), glutatyon redüktaz (GR), asetilkolinesteraz (AChE), karboksilesteraz (CaE), glutatyon peroksidaz (GPx), katalaz (CAT), alanin amino transferaz (ALT), aspartat amino transferaz (AST), laktat dehidrogenaz (LDH), Na^+/K^+ -ATPaz, Ca^{+2} -ATPaz, Mg^{+2} -ATPaz ve toplam ATPaz biyobelirteçleri kullanılarak incelenmiştir.

Pestisitlerin ve karışımlarının 96 saatlik uygulamaları sonucunda, thiakloprid ve trifloksistrobin'in LC_{50} değerleri karışımının bütün iribaşları öldürdüğü belirlenmiştir. Her iki pestisit ayrı ayrı uygulama değerlerinin ve pestisit karışımına ait en düşük konsantrasyonların seçilen biyobelirteç enzimleri (aktivasyon/inhibisyon) önemli düzeyde etkilediği saptanmıştır. Pestisit karışımlarının 96 saatlik LC_{50} , $LC_{50}/2$, $LC_{50}/10$, $LC_{50}/20$, $LC_{50}/50$ ve $LC_{50}/100$ uygulama değerlerine 24 saat boyunca maruz kalan iribaşlarda da enzim aktivitelerinin önemli düzeyde etkilendiği belirlenmiştir.

Araştırma sonuçları, seçilen pestisitlerin 50-58. evredeki *X. laevis* iribaşlarında toksik potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca, pestisitlerin karışım olarak uygulandıklarında, $LC_{50}/2$ ve LC_{50} değerlerinden çok daha düşük konsantrasyonlarda etki gösterdiği belirlenmiştir. Ayrıca sonuçlarımız, *X. laevis* iribaşlarının sucul ekosistemlerde, pestisit kirliliğinin belirlenmesini amaçlayan çalışmalar için uygun bir test organizması olduğunu ve seçilen biyokimyasal belirteçlerin de pestisit toksisitesini iyi bir şekilde yansıttığını göstermektedir.

ANAHTAR KELİMELER: Thiakloprid, Trifloksistrobin, *Xenopus laevis*, Biyobelirteç, CaE, AChE, GST, GR, GPx, CAT, ALT, AST, LDH, ATPaz

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

INVESTIGATION OF ACUTE TOXIC EFFECTS OF THIACTOPRID AND TRIFLOXYSTROBIN ON *Xenopus laevis* TADPOLES

Miraç UÇKUN

İnönü University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Biology
163 + xi pages

2013

Supervisor: Prof. Dr. Murat ÖZMEN

The chemical methods are the most widely used one for pest control around the world. Agricultural ingredients are synthetic chemicals called pesticides on the basis of the struggle. This study aimed to evaluate toxicity of neonicotinoid insecticide thiacloprid, strobilurin fungicide trifloxystrobin and their mixtures on early developmental stages of *Xenopus laevis* by using various biochemical markers. In the result of 96-hour test, median lethal concentration (LC₅₀) values of thiacloprid and trifloxystrobin were determined as 3.41 mg AI/L and 0.09 mg AI/L, respectively. The application concentrations of selected pesticides were determined according to the 96-hour LC₅₀. Tadpoles in stage 50 to 58. were exposed to LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/10, LC₅₀/20, LC₅₀/50 and LC₅₀/100 concentrations of thiacloprid and trifloxystrobin separately and also double mixtures (1:1) of these concentration in 96-hour static renewal test system. In addition to the 96-hour tests, tadpoles were also exposed to pesticide mixtures for 24-hours using LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/10, LC₅₀/20, LC₅₀/50 and LC₅₀/100 values. Furthermore, effects of pesticides were determined by using glutathione S-transferase (GST), glutathione reductase (GR), acetylcholinesterase (AChE), carboxylesterase (CaE), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT), alanine amino transferase (ALT), aspartate amino transferase (AST), lactate dehydrogenase (LDH), Na⁺/K⁺-ATPase, Ca²⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase ve total ATPase as biomarkers in amphibian tadpoles.

In the results of 96-hour pesticide or pesticide mixture applications, mixtures of Thiacloprid and Trifloxystrobin in LC₅₀ value caused to the death of all tadpoles. The individual values of both pesticides and the lowest concentrations of pesticide mixtures significantly affected (inhibited/activated) selected enzyme markers. The enzyme activities were also affected in tadpoles exposed to mixtures of pesticides using the application values of LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/10, LC₅₀/20, LC₅₀/50 and LC₅₀/100 of 96-hour exposure time for 24-hour exposure.

The results indicated that selected pesticide and pesticide mixtures have toxic potential on *X. laevis* tadpoles in stage 50 to 58. Furthermore, when applied as mixtures, the pesticides showed a toxic effect on tadpoles at concentrations much lower than their LC₅₀/2 or LC₅₀ values. Also, our results showed that *X. laevis* tadpoles at stage 50 to 58 can be used as a suitable test organism and the selected biochemical markers may also serve well for studies with the aim of determining pesticide pollution in aquatic ecosystems.

KEY WORDS: Thiacloprid, Trifloxystrobin, *Xenopus laevis*, Biomarker, CaE, AChE, GST, GR, GPx, CAT, ALT, AST, LDH, ATPase

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın konusunun belirlenmesinde ve çalışma süresince karşılaşılan sorunların çözümünde öneri ve desteklerini esirgemeyen, öğrencisi olmaktan gurur duyduğum danışman hocam Sayın Prof. Dr. Murat ÖZMEN'e;

Çalışmalarım süresince uyarı ve önerileri ile bana sürekli destek olan Tez İzleme Komitesindeki değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Özfer YEŞİLADA ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Didem GÖKÇE'ye;

Çalışmalar süresince öneri ve destekleriyle bana ağabeylik yapan değerli hocam Doç. Dr. Abbas GÜNGÖRDÜ'ye, laboratuvar çalışmalarında büyük emeği olan değerli dostum Öğr. Gör. Ertan YOLOĞLU'na;

Emeğini hiç üzerimden ayırmayan, akademisyenlik yolunda öncü olan değerli ağabeyim Yrd. Doç. Dr. Mustafa UÇKUN'a

Çalışmalar süresince büyük özverisi ile bana destek olan hayatımı yaşanır kılan sevgili eşim Yrd. Doç. Dr. Aysel ALKAN UÇKUN'a;

Her konuda benden desteklerini esirgemeyen ve hep yanımda olan sevgili ANNEM'e ve BABAM'a;

Bu çalışmaya maddi olarak destek sağlayan İnönü Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimine (Proje No: 2010/116);

EN İÇTEN DİLEKLERİMLE TEŞEKKÜR EDERİM...

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	ix
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Su Kirliliği	4
1.2. Pestisitler	6
1.2.1. Pestisit Tarihçesi	7
1.2.2. Pestisitlerin Kirliliğe Neden Olma Yolları	9
1.2.3. Pestisitlerin Ekolojik Dengeye Etkileri	10
1.2.4. Türkiye’deki Pestisit Kullanımı	12
1.2.5. Pestisitlerin Sınıflandırılması	13
1.3. Toksik Etkileri Değerlendirilen Pestisitler	16
1.3.1. Neonikotinoidler	16
1.3.1.1. Thiaklopid	20
1.3.2. Strobilurinler	21
1.3.2.1. Strobilurinlerin Etki Mekanizması	22
1.3.2.2. Trifloksistrobin	23
1.4. Biyoindikatörler	24
1.4.1. Sucul Ekosistemlerin Biyoindikatörü Olarak <i>Xenopus laevis</i>	26
1.4.1.1. <i>Xenopus laevis</i>	26
1.4.1.2. <i>Xenopus laevis</i> Sistematığı	28
1.4.1.3. <i>Xenopus laevis</i> ’in Morfolojisi ve Anatomisi	28
1.4.1.4. <i>Xenopus laevis</i> ’in Üremesi, Embriyo ve Larva Gelişimi	30
1.4.1.5. <i>Xenopus laevis</i> ’in Beslenmesi ve Bakımı	33
1.5. Biyobelirteçler	34
1.6. Çalışmada Kullanılan Biyobelirteç Enzimler	35
1.6.1. Biyotransformasyon enzimleri	35
1.6.1.1. Glutasyon S-transferaz	36
1.6.2. Antioksidan Savunma Sistemleri	38
1.6.3. Antioksidan Enzimler	38

1.6.3.1.	Glutasyon Peroksidaz	38
1.6.3.2.	Katalaz.....	40
1.6.3.3.	Glutasyon Redüktaz.....	41
1.6.4.	Esterazlar.....	42
1.6.4.1.	Karboksilesteraz	43
1.6.4.2.	Asetilkolinesteraz	45
1.6.5.	Laktat Dehidrogenaz	48
1.6.6.	Aminotransferazlar.....	49
1.6.6.1.	Alanin Aminotrasferaz	50
1.6.6.2.	Aspartat Aminotrasferaz	50
1.6.7.	ATPaz Enzimleri.....	51
2.	KAYNAK ÖZETİ.....	54
2.1.	Neonikotinoid ve Strobilurin Grubu Pestisitlerle Yapılan Çalışmalar....	54
2.2.	Diğer Pestisit ve Kimyasallarla Yapılan Çalışmalar.....	59
3.	MATERYAL VE YÖNTEM	67
3.1.	Çalışmada Kullanılan Pestisitler	67
3.2.	<i>Xenopus laevis</i> Yumurta ve İribaşlarının Sağlanması.....	67
3.3.	Toksisite Testlerinin Uygulanması.....	68
3.3.1.	Pestisitlerin LC ₅₀ Değerlerinin ve Uygulama Konsantrasyonlarının Belirlenmesi	68
3.3.2.	Subakut Toksisite Deneyleri	69
3.4.	Ortam pH'sının Saptanması	70
3.5.	İribaşların Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri	70
3.6.	Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi	70
3.6.1.	Glutasyon S-transferaz Aktivitesi.....	71
3.6.2.	Glutasyon Redüktaz Aktivitesi	71
3.6.3.	Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi.....	71
3.6.4.	Katalaz Aktivitesi.....	72
3.6.5.	Karboksilesteraz Aktivitesi	72
3.6.6.	Asetilkolinesteraz Aktivitesi	72
3.6.7.	Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi	73
3.6.8.	Aspartat Aminotransferaz Aktivitesi.....	73
3.6.9.	Alanin Aminotransferaz Aktivitesi	74
3.7.	ATPaz Enzim Aktiviteleri.....	74
3.7.1.	ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar.....	74

3.7.2.	ATPaz Enzim Aktivitelerinin Ölçümü.....	75
3.7.3.	İnorganik Fosfat Tayini.....	76
3.7.4.	ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması	77
3.8.	Toplam Protein Miktarı Tayini	78
3.9.	İstatistiksel Analiz ve Hesaplamalar	78
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	80
4.1.	96 Saatlik Çalışmalar İle İlgili Bulgular	81
4.1.1.	96 Saatlik LC ₅₀ ve NOAEC Değerleri	81
4.1.2.	96 Saatlik Uygulamalarda Ortamların pH Değerleri.....	81
4.1.3.	96 Saatlik Çalışmalarda Belirlenen Ölüm Oranları.....	82
4.1.4.	96 Saatlik Trifloksistrobin Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi.....	83
4.1.5.	96 Saatlik Thiaklopid Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi.....	89
4.1.6.	96 Saatlik Trifloksistrobin+Thiaklopid Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi	95
4.2.	24 Saatlik Çalışmalar İle İlgili Bulgular	101
4.2.1.	24 Saatlik Uygulamalarda Ortamların pH Değerleri.....	101
4.2.2.	24 Saatlik Çalışmalarda Belirlenen Ölüm Oranları.....	101
4.2.3.	24 Saatlik Trifloksistrobin+Thiaklopid Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi	102
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ	108
6.	KAYNAKLAR.....	141
	ÖZGEÇMİŞ	163

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1.	Pestisitlerin doğadaki döngüsü.....	11
Şekil 1.2.	Omurgalı nAChR'lerinin fonksiyonel yapılanması, çeşitliliği ve kolinerjik sinaps boyunca nörotransmitter iletimi.....	17
Şekil 1.3.	Nikotin ve nitrometilen (C = CHNO ₂), nitroguanidin (C = NNO ₂) ve siyanoamidin (C = NCN) yan gruplarına sahip neonikotinoid insektisitlerin kimyasal yapıları.....	18
Şekil 1.4.	Thiakloprid'in moleküler yapısı.....	20
Şekil 1.5.	Strobilurinlerin temel yapıları.....	21
Şekil 1.6.	Sentetik strobilurin analoglarının sentezine öncülük eden yan gruplar.....	22
Şekil 1.7.	Trifloksistrobinin moleküler yapısı.....	24
Şekil 1.8.	<i>Xenopus laevis</i> türü kurbağalara ait dişi (♀) ve erkek (♂) bireyler.	27
Şekil 1.9.	<i>Xenopus laevis</i> 'in bazı metamorfoz evreleri.....	32
Şekil 1.10.	Kenobiyotik-GSH konjugasyonu.....	37
Şekil 1.11.	GPx'in katalitik döngüsü.....	39
Şekil 1.12.	CAT enziminin katalitik ve peroksidatif aktiviteleri.....	40
Şekil 1.13.	GR'ın GSH metabolizmasındaki yeri.....	41
Şekil 1.14.	Pretröitlerin esteraz aracılı hidrolizi.....	44
Şekil 1.15.	CaE'nin paratyon (OP pestisit) tarafından inhibisyon reaksiyonu...	45
Şekil 1.16.	İmpuls iletimi ve AChE'nin impuls iletimini sonlandırma mekanizması.....	46
Şekil 1.17.	AChE enziminin yapısal özellikleri.....	47
Şekil 1.18.	Laktat dehidrogenaz tarafından katalizlenen reaksiyon.....	48
Şekil 1.19.	Aminotransferaz tarafından katalizlenen reaksiyon.....	50
Şekil 1.20.	Plazma zarındaki Na ⁺ /K ⁺ -ATPazının çalışma modeli.....	52
Şekil 1.21.	İskelet kas hücrelerinin sarkoplazmik retikulum zarında yer alan Ca ²⁺ -ATPazının çalışma modeli.....	53
Şekil 3.1.	Fosfat derişimi ile absorbands arasındaki doğrusal ilişkiyi gösteren inorganik fosfat (Pi) standart eğrisi.....	77
Şekil 3.2.	BSA standart eğrisi.....	78
Şekil 5.1.	96 saatlik TFS, THI ve TFS+THI karışım uygulamaları ile 24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının ALT (A), AST (B) ve LDH (C) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.....	113
Şekil 5.2.	96 saatlik TFS, THI ve TFS+THI karışım uygulamaları ile 24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının GST (A), CaE (B) ve AChE (C) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.....	117
Şekil 5.3.	96 saatlik TFS, THI ve TFS+THI karışım uygulamaları ile 24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının GR (A), CAT (B) ve GPx (C) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.....	120
Şekil 5.4.	96 saatlik TFS, THI ve TFS+THI karışım uygulamaları ile 24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının Na ⁺ /K ⁺ ATPaz (A) ve toplam ATPaz (B) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.....	123

Şekil 5.5. 96 saatlik TFS, THI ve TFS+THI karışım uygulamaları ile 24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının Mg^{+2} ATPaz (A) ve Ca^{+2} ATPaz (B) enzim aktiviteleri üzerine etkileri. 124

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1.	Sucul ortamlardaki kirlilik kaynakları.....	5
Çizelge 1.2.	Pestisit gelişim ve uygulama kronolojisi.....	9
Çizelge 1.3.	Türkiye'de Pestisit Tüketim Miktarları (kg/L)	13
Çizelge 1.4.	<i>Xenopus laevis</i> 'e ait bazı tür özellikleri.....	29
Çizelge 3.1.	ATPaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü ortam koşulları ve inkübasyon ortamındaki iyonların final derişimleri	75
Çizelge 3.2.	ATPaz enzimlerinin aktivite analiz şeması	76
Çizelge 4.1.	Pestisitlerin 96 saatlik LC ₅₀ ve NOAEC değerleri	81
Çizelge 4.2.	96 saatlik çalışmalarda elde edilen ortalama pH değerleri.....	82
Çizelge 4.3.	96 saatlik çalışmalarda belirlenen ölüm oranları.....	83
Çizelge 4.4.	96 saatlik TFS uygulamasının ALT, AST ve LDH enzim aktiviteleri üzerine etkisi	84
Çizelge 4.5.	96 saatlik TFS uygulamasının GST, CaE ve AChE enzim aktiviteleri üzerine etkisi	85
Çizelge 4.6.	96 saatlik TFS uygulamasının GR, CAT ve GPx enzim aktiviteleri.....	87
Çizelge 4.7.	96 saatlik TFS uygulamasının ATPaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi	88
Çizelge 4.8.	96 saatlik THI uygulamasının ALT, AST ve LDH enzim aktiviteleri üzerine etkisi	90
Çizelge 4.9.	96 saatlik THI uygulamasının GST, CaE ve AChE enzim aktiviteleri üzerine etkisi	91
Çizelge 4.10.	96 saatlik THI uygulamasının GR, CAT ve GPx enzim aktiviteleri üzerine etkisi.....	92
Çizelge 4.11.	96 saatlik THI uygulamasının ATPaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi	94
Çizelge 4.12.	96 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının ALT, AST ve LDH enzim aktiviteleri üzerine etkisi.....	96
Çizelge 4.13.	96 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının GST, CaE ve AChE enzim aktiviteleri üzerine etkisi.....	97
Çizelge 4.14.	96 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının GR, CAT ve GPx enzim aktiviteleri üzerine etkisi.....	99
Çizelge 4.15.	96 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının ATPaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi	100
Çizelge 4.16.	24 saatlik çalışmalarda elde edilen ortalama pH değerleri.....	101
Çizelge 4.17.	24 saatlik çalışmalarda belirlenen ölüm oranları.....	102
Çizelge 4.18.	24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının ALT, AST ve LDH enzim aktiviteleri üzerine etkisi.....	103
Çizelge 4.19.	24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının GST, CaE ve AChE enzim aktiviteleri üzerine etkisi.....	105
Çizelge 4.20.	24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının GR, CAT ve GPx enzim aktiviteleri üzerine etkisi.....	106

Çizelge 4.21. 24 saatlik TFS+THI uygulamasının ATPaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi.....	107
---	-----

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ACh	Asetilkolin
AChE	Asetilkolinesteraz
ACTI	Asetiltiyokolin iodid
ALP	Alkalen fosfataz
ALT	Alanin aminotransferaz
AST	Aspartat aminotransferaz
ASTM	Amerikan Standartları Enstitüsü
ATPaz	Adenozin trifosfataz
BChE	Bütirilkolinesteraz
BSA	Sığır serum albümini
CaE	Karboksilesteraz
CAT	Katalaz
CDNB	1-kloro-2,4-dinitrobenzen
ChE	Kolinesteraz
DTNB	5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Etilendiamin tetraasetik asit
EGTA	Etilen glikol-bis (2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraasetikasit
FAO	Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu
FETAX	Frog Embryo Teratogenesis Assay- <i>Xenopus</i>
GR	Glutasyon redüktaz
GPx	Glutasyon peroksidaz
GSH	Redükte glutasyon
GST	Glutasyon S-transferaz
GSSG	Okside glutasyon
hCG	İnsan koryonik gonadotropin
IU	Ünite
LC ₅₀	Ortalama öldürücü konsantrasyon
LOAEC	Olumsuz etki görülen en düşük konsantrasyon
LDH	Laktat dehidrogenaz
nAChR	Nikotinik asetilkolin reseptörü
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid (okside)
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid (redükte)
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NaN ₃	Sodyum azid
NOAEC	Hiçbir olumsuz etkinin görülmediği konsantrasyon
OP	Organofosforlu
PAH	Polisiklik aromatik hidrokarbon
PCB	Poliklorlu bifenil
PNPA	<i>P</i> -nitrofenol asetat
ROS	Reaktif oksijen türü
USEPA	Amerika Birleşik Devletleri Çevre Koruma Kurumu
SOD	Süperoksit dismutaz
THI	Thiaklopid
TFS	Trifloksistrobin
WHO	Dünya Sağlık Örgütü

1. GİRİŞ

Dünyadaki endüstrileşme ile birlikte toplumların tüketimlerinin giderek artması beraberinde herkesin şikâyetinde bulunduğu çevre sorunlarını da getirmiştir.

Çevre kirliliği, “*insanların her türlü aktiviteleri sonucu çevreye katılarak havada, suda ve toprakta oluşan olumsuz gelişmeler ile doğal sistemler ya da organizmalar gibi ekosistemlerde kararsızlığa ve düzensizliğe yani ekolojik dengenin bozulmasına neden olan ve aynı aktiviteler sonucu ortaya çıkan koku, gürültü ve atıkların çevrede oluşturduğu arzu edilmeyen sonuçları*” olarak tanımlanmaktadır (Kocataş, 2010).

Doğal çevrede, insan ve doğal kaynaklı hasarlar sonucu meydana gelen kirlilik, bugünkü dünyanın karşı karşıya kaldığı bir sorundur. Her türlü çevre kirliliği tipinde, çevrenin kirlenmesine neden olan atık maddeler (ksenobiyotikler); atık maddeleri aktiviteleri sonucu doğrudan ya da dolaylı olarak çevreye bırakarak kirliliğe neden olan kuruluşlar yani kirletenler; bu kirletenler tarafından bırakılan atık maddelerin taşındığı bir ekosistem ya da canlıları kapsayan bir alıcı ortam bulunmaktadır (Alloway ve Ayres, 1997).

Çevrede, canlıların fiziki ve biyolojik unsurlarla olan ilişkileri, onların sağlıklı gelişmesine olanak veriyorsa, doğal denge mümkün olduğu kadar korunmakta, tersi durumlarda ise bu denge bozulmaktadır. Gelişen teknoloji, endüstrileşme ve nüfus artışı ile birlikte bu denge sürekli bozularak, çevre kirliliğinin önemli boyutlarda artmasına neden olmaktadır. Çevre kirliliğine neden olan belli başlı faktörler, ülkelerin kalkınmalarında temel unsur olan tarım, sanayi, ulaşım, turizm ve enerji sektörleridir (Gökmen, 2011).

Çevre kirliliği, atıkların kaynağına (tarımsal kirlilik vb.), yapısına (pestisit kirliliği) ya da alıcı ortamına göre (su kirliliği vb.) sınıflandırılmaktadır (Alloway ve Ayres, 1997).

Günümüzde çevre kirliliğine yol açan etkenler arasında pestisitler önemli bir yer tutmaktadır. Pestisitlerin, bir ekosistem veya bir organizma üzerinde olumsuz etkilerinin saptanabilmesi için ilk önce laboratuvar koşullarında çeşitli organizmalar için olası risk analizlerinin yapılması gerekmektedir. Sucul ekosistemdeki pestisit kirliliği, yaşamlarının önemli bir bölümünü sucul habitatlarda geçirmeleri nedeniyle

amfibi popülasyonları için önemli bir risk oluşturmaktadır. Buldukları ekosistemde organizmaların birden fazla pestisit maruz kalmaları nedeniyle pestisit karışımlarının etkilerini değerlendirmek de önemlidir.

Son yıllarda tüm dünyada amfibi popülasyonlarında önemli düzeyde azalma olduğu rapor edilmiştir (Richards ve Kendall, 2003). Amfibiler sucul ekosistemlerde çevresel kirleticilere maruz kalan yüksek risk grubu içerisinde bulunan omurgalı hayvanlardandır (Mann ve Bidwell, 2000). Hem sucul hem de karasal hayat safhalarından dolayı amfibiler her iki ortamda da toksik maddelere maruz kalabilirler.

Amfibi iribaşlarının ergin bireylere göre toksik maddelere daha duyarlı oldukları bilinmekte ve pestisitlerin iribaşlar üzerine yoğun toksisite gösterdikleri hesaba katıldığında, popülasyondaki bu azalma ile ilgili sebepler listesinde ilk sıralarda pestisitler yer almaktadır (Tavera-Mendoza vd., 2002; Blaustein, 1994). Amfibilerin çoğunun yumurta ve embriyo gelişimini suda tamamladığı ve amfibi yumurtalarının yarı geçirgen özellikte olmaları sebebi ile kirleticileri alma oranının arttığı ve sularda birikmiş olan kirleticilerin yumurta gelişimi ile larvaların metamorfoz ve büyümeleri üzerinde yaptıkları etkilerin türlerin devamı için çok önemli bir problem olduğu açık bir gerçektir (Sayım, 1998).

Bu araştırmada da bu doğrultuda son dönemde alternatif pestisitler olarak piyasaya sürülen neonikotinoid insektisilerden “Thiakloprid” ve strobilurin fungusitlerden “Trifloksistrobin” inin toksik etkilerinin araştırılması ve olası risk değerlendirmesinin yapılması amaçlanmıştır. Bu pestisitlerin toksik etkilerinin saptanması amacı ile biyolojisi en iyi bilinen amfibi türlerinden *Xenopus laevis* iribaşları test materyali olarak kullanılmıştır. *Xenopus laevis*'in pestisitler dâhil pek çok çevresel kirleticiye duyarlılığının yüksek olduğu bildirilmiştir (Dumpert, 1987). Ayrıca laboratuvar şartlarında kolay bakımı, yumurtlamanın indüklenebilirliği, larval dönemden erginliğe geçişin hızlı olması gibi avantajları onu, diğer kurbağa türleri ile karşılaştırıldığında daha çok kabul gören bir test organizması yapmaktadır (ASTM, 1998). *X. laevis* iribaşları, seçilen insektisit ve fungusit etkisinin test organizmasında belirlenmesi ve pestisit kombinasyonlarının sucul ekosistemde olası riskinin değerlendirilmesi amacı ile kullanılmıştır.

Çevresel kimyasallara karşı biyolojik sistemde moleküler, hücresel, fiziksel veya davranışsal değişiklikler şeklinde gelişen cevaplar oluşur ki bunlara biyobelirteç denir (Peakall ve Walker, 1994). En çok kullanılan biyobelirteçler, ksenobiyotiklerin ve metabolitlerinin detoksifikasyonuna katılan biotransformasyon sistemi ve antioksidan enzimleridir (van der Oost vd., 2003). Bu seçilen pestisitlerin farklı dozlarına ($LC_{50}/100$, $LC_{50}/50$, $LC_{50}/20$, $LC_{50}/10$, $LC_{50}/2$ ve LC_{50}) ayrı ayrı ve karışım halinde maruz bırakılan *Xenopus* iribaşlarında çeşitli enzimlerin zamana bağlı aktivite değişimleri belirlenmiş ve bu enzimlerin biyobelirteç olarak kullanılıp kullanılmıyacağı değerlendirilmiştir. Seçilen enzimler, oksidatif stresin varlığını ve derecesini ortaya koymak için biyobelirteç olarak kullanılan katalaz (CAT), glutasyon redüktaz (GR), glutasyon peroksidaz (GPx); detoksifikasyondan sorumlu olan glutasyon S-transferaz (GST), karboksilesteraz (CaE); çevresel kirleticilerin nörotoksik etkilerini ortaya koymak amacıyla sıklıkla biyobelirteç olarak kullanılan asetilkolinesteraz (AChE) ve doku hasarının belirlenmesi amacıyla kullanılan laktat dehidrogenaz (LDH), alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST) ve son olarak osmoregülasyon metabolizması parametreleri olarak kullanılan ATPaz'lardır.

Canlılar, çevredeki kimyasal maddelerin sadece birine değil genellikle onların birçoğuna maruz kalırlar. Başka maddelerle birlikte kombinasyon halinde pestisitlere maruz kalma, pestisit tek başına etkisinden farklı etkiler gösterebilir. Aynı şekilde, iki pestisit beraber kullanıldığında göstereceği etki, her biri ayrı ayrı olarak kullanıldığında ortaya çıkacak etkiden farklı olabilir. Pestisit karışımının ya da pestisit diğer maddelerle bir ekosistemde oluşturabileceği kombinasyonun toksisitesini önceden anlayabilmek olanaksızdır. Maddeler birlikte kullanıldığında, etki; additif (eklemeli, kümülatif, $2+3=5$), sinerjistik (birbirinin etkisini arttıran, $2+2=20$) ya da antagonistik (birbirinin etkisini azaltan, $4+0=1$) olabilir ve etkileşimin karakteri, bileşiklerin farklı etkileri için farklı olabilmektedir. Bu etkileşim çalışmaları, araştırılan kimyasalların toksisite mekanizmalarının daha iyi anlaşılmasına öncülük eder. Ayrıca, etkisi araştırılacak maddelerin karışım halinde kullanılması, canlılar için toksik tehlikeyi daha gerçekçi belirlememize yardımcı olur. Örnek olarak, additif etkiye iki organofosfat insektisit birlikte verildiğinde kolinesteraz inhibisyona neden olması; sinerjistik etkiye hepatotoksik olmayan izopropanol ve hepatotoksik karbon tetraklorit etkileşimi verilebilir. Karbon

tetrakloridin hepatotoksitesisi, izopropanolün eklenmesi sonucu, tek başına kullanıldığındaki etkisinden daha şiddetli olmaktadır. Antagonistik etkiye ise arsenik, civa ve kurşun gibi metal iyonlarının dimerkaprolü şelatlayarak etkisini azaltmaları verilebilir (Klaassen, 2001).

1.1. Su Kirliliği

Su, ekosistemdeki yaşamın sürdürülmesinde oynadığı rol itibariyle doğal kaynaklar içerisinde çok önemli bir yere sahiptir. Güneş enerjisinin yardımıyla dünyada bulunan sular hidrolojik döngü içerisinde hareket ederler (Yüksek, 2004). Karasal ve sucul ekosistemler hidrolojik çevrim ve meteorolojik olaylar nedeniyle birbirleriyle etkileşim içerisinde (Okuşluk, 2008). Yerkürede yaşayan tüm canlılar tüm metabolik faaliyetleri için ihtiyaç duydukları suyu bu hidrolojik döngüden karşılarlar ve kullandıktan sonra tekrar aynı döngüye iade ederler. Bu döngü, suyun belirli bir alanda ve belirli bir miktarda bulunmasını sağlar (Yüksek, 2004).

Günümüzde sanayileşme ve kentleşme sürecine bağlı olarak, su kullanım ve tüketim oranları yükselmekte, sürdürülebilir temiz su kaynaklarına olan ihtiyaç her gün biraz daha artmaktadır. Öte yandan düzensiz ve hatalı kullanımlar sonucu tıpkı durgun sular gibi, akarsular da fiziksel, kimyasal ve biyolojik bakımdan aşırı derecede kirlenmektedir. Doğal çevre, ekosistemler ve ekolojik türler üzerindeki baskılar giderek ağırlaşmakta, yeraltı ve yerüstü su kaynaklarının (özellikle akarsuların) kendi kendini temizleme ve yenileme yetenekleri geri dönülmez biçimde köreltilmektedir (Bulut ve Tüfekçi, 2005).

Sulak alanlardaki habitat bozulması yalnızca fiziksel değişimlerden ibaret değildir. Nüfus artışı ve kentleşme beraberinde katı ve sıvı atık sorununu getirmiştir. Endüstrileşme ve tarımsal üretim teknolojileri bu sorunu daha da ağırlaştırmıştır (Bulut ve Tüfekçi, 2005). Her türlü insan aktivitesinin bir sonucu olarak ortaya çıkan çok sayıda ksenobiyotik, çeşitli yollarla sucul ekosistemlere karışıp, yeraltı ve yer üstü su sistemleri aracılığıyla sulak alanları (delta, koy, lagün, göl, deniz gibi) ciddi anlamda kirlenmekte ve hatta bu alanlarda birikebilmektedirler. Bu kirlenme ve birikim sonuçları, başta sucul ekosistemlerde yaşayan organizmalar olmak üzere, bu ürünleri tüketen insana da yönelik sağlıkla ilgili çok çeşitli tehditleri beraberinde getirmektedir. Bu amaçla sucul ekosistemlerin bu tip kirlenmeler tarafından

kirletilmesiyle meydana gelen olumsuz etkilerin, ne düzeyde olduğunu bilmesi ve araştırılmasına bilimsel yönden ihtiyaç duyulmaktadır (Okuşluk, 2008).

FAO (Birleşmiş Milletler Gıda ve Tarım Organizasyonu) su kirliliğini; “canlı kaynaklara zararlı, insan sağlığı için tehlikeli, balıkçılık gibi çalışmalarını engelleyici, su kalitesini zedeleyici etkiler yaratabilecek maddelerin suya atılması” şeklinde tanımlarken, Uluslararası Oşenografi Komisyonu (IOC), su kirliliğini, “insanoğlu tarafından doğrudan ve dolaylı olarak sucül ekosistemlere verilen ksenobiyotik (metaller, deterjanlar, klor, siyanitler, amonyak, pestisitler, polikorlu bifeniller, petrol hidrokarbonları, asitler ve alkaliler) veya enerji sonucunda, su canlıları için zararlı olan, insan sağlığını tehdit eden, sucül ortamlardaki aktiviteyi değiştiren, suyun içme suyu olarak kullanımında kaliteyi bozan faktörlerin tümüdür” şeklinde tanımlamıştır (Uçkun, 2011). Bu kirlilik kaynakları Çizelge 1.1.’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Sucül ortamlardaki kirlilik kaynakları.

Kirlilik Kaynağının Türü	Kirleticinin Cinsi
<i>Tabii Kaynaklar</i>	<ul style="list-style-type: none">• Atmosferden gelen kirleticiler• Çözülmüş mineraller• Çürümüş bitkiler• Yağmur suları
<i>Tarımsal Faaliyetler</i>	<ul style="list-style-type: none">• Tarımsal atıklar• Gübreler• Pestisitler• Toprak erozyonu
<i>Kullanılmış Sular</i>	<ul style="list-style-type: none">• Yerleşim yerlerinden gelen yağmur suları• Kentsel sıvı atıkları• Sanayi sıvı atıkları• Deniz ulaşımı sıvı atıkları
<i>Biriktirme Yapıları</i>	<ul style="list-style-type: none">• Sedimentlerin su ile sürüklenmesi• Oksijen yetersizliği
<i>Diğer Kaynaklar</i>	<ul style="list-style-type: none">• Maden işletmeleri• Çöp dökme alanları

1.2. Pestisitler

1950’de 2.5 milyar olan dünya nüfusu, 2000 yılında 6.1 milyara ulaşmış ve bu sayının 2050’li yılların başlarında 9.1 milyara (7.7 ile 10.6 milyar arası) ulaşacağı hesaplanmıştır (Sexton vd., 2007; Carvalho, 2006). Dünya nüfustaki bu hızlı artış, tarım arazilerinin kısıtlı olması ve değişen çevre şartları ile birlikte gıda maddelerine duyulan gereksinim de yoğun bir şekilde artmaktadır ve bu durum tarımda birim alandan daha yüksek verim ve daha kaliteli ürün elde edilmesini zorunlu hale getirmektedir. Ancak, dünyada artan nüfusa paralel olarak tarım alanları genişlememektedir. (Canik ve Yüksel, 2012). Günümüzde tarımsal arazilerden yüksek verim elde edebilmek için kimyasal maddeler yoğun bir şekilde kullanılmaktadır. Çevrede yaygın olarak kullanılan bu kimyasal ürünlerden biri de pestisitlerdir (Delen vd., 2005).

Amerika Çevre Koruma Dairesi (U.S. Environmental Protection Agency, EPA)’ ne göre tarımsal üretimi olumsuz yönde etkileyen haşereler, kemiriciler, mantarlar ve yabancı otlar gibi zararlılara karşı kullanılan gelişim önleyici, yok edici, uzaklaştırıcı ya da sayılarını azaltıcı etkiye sahip madde ya da madde karışımları olan fiziksel, kimyasal veya biyolojik ajanlara pestisit denir (Pestisit kelimesi, Latince kökenli olup *pest* = zararlı, *cide* = öldürücü anlamına gelir.) (Klaassen, 2001). Bu nedenle dünyada farklı kimyasal formülasyona sahip çok sayıda madde, her yıl yaklaşık 3 milyon ton civarında üretilmekte ve 30 milyar dolarlık bir ticari hacim oluşturmaktadır (Meister, 1999).

Sadece hedef seçilen zararlılara etkili olması arzu edilen pestisitler imalat, depolama, pazarlama ve kullanılma sırasında hava, su ve toprağa karışarak hedef olmayan canlıları olumsuz yönde etkilemektedir. Buna bir de bilinçsiz ve dikkatsiz kullanım da eklenirse, suda, toprakta, bitkisel ve hayvansal besinler de artan oranlarda birikirler (Şanlı, 1984). Bu olumsuzlukları giderebilmek için ilk sentezlenen maddelerin daha güvenilir formları olan ikinci ve üçüncü jenerasyonları sentezlenmiştir. Ancak, her pestisit belli bir toksisitesi vardır ve sağlık açısından tam güvenceli bir pestisit yoktur (Vural, 2005). Amaçsız, sınırsız, nerede ise kontrolsüz olarak çevremize atılan pestisitler, canlıları öldürmek üzere kullanılan biyosidal ve toksik kimyasal grubu maddelerdir. Doğal yaşamla ilgili değerlendirmelerde, her türlü pestisit bu özelliğinin göz önüne alınması gerekir.

Pestisitlerin hava, su, toprak, yağmur, kar, buz ve sis gibi hemen hemen her türlü çevresel ögede bulunabilmelerinden dolayı, yeryüzündeki bütün organizmalar pestisitlerden etkilenirler. Amerika Bileşik Devletleri'ndeki bir yasada "ekonomik zehirler" olarak tanımlanan pestisitler, üretildikleri tesislerden veya kullanıldıkları alanlardan farklı yollarla alıcı doğal ortamlara ve hatta çok uzak mesafelere ulaşarak ekolojik problemlere neden olmaktadır (Güler ve Çobanoğlu, 1997). Bu nedenlerden dolayı, doğal kaynakları kirleten pestisitlerin bu ortamlardaki yaşamlarını sürdüren organizmalar üzerinde ne tür etkiler oluşturacağına bilinmesi büyük önem kazanmaktadır.

1.2.1. Pestisit Tarihçesi

Pestisitlerin kullanımı çok eski tarihlere dayanmaktadır. M.Ö. 1500'lere ait bir papirüs üzerinde bit, pire ve eşek arılarına karşı insektisitlerin hazırlanışına dair kayıtlar bulunmuştur. Bilinen ilk pestisit, Mezopotamya'da yaklaşık 4500 yıl önce antik Sümer'de fungusit olarak kullanılan elemental kükürt tozudur. Kükürtlü bileşikler günümüzde de meyvecilikte yaygın olarak kullanılan pestisitlerdir. 15. yüzyılda Çin'de arsenikli bileşikler, civa, kurşun, krizantem çiçeği özütü ve tütün yaprakları gibi doğal kaynaklı bileşikler gibi toksik kimyasallar, tarım ürünlerindeki zararlıların öldürülmesinde kullanılmışlardır. 17. yüzyılda nikotin sülfat, insektisit olarak kullanılmak üzere tütünden ekstrakte edilmiştir. 19. yüzyılda iki doğal pestisit kullanılmaya başlanmıştır. Bunlardan biri krizantemden elde edilen pyrethrum (pire otu) ve diğeri de tropik bitki olan *Derris elliptica* köklerinden elde edilen rotenondur (Miller, 2002). Bu ajanlar, teknolojisi geliştirilmiş olarak bugün de kullanılmaktadır. Krizantem özütü piretroitler, tütün yaprakları nikotinoidler ve neonikotinoidler şeklinde ticari olarak satılmaktadır (Klaassen, 2001).

Zararlı böceklerin kontrolünde 1940'lı yıllara kadar kullanılan doğal bileşikler, pahalı olan maliyetleri ve kararsız olmaları nedeniyle yerini sentetik bileşiklere bırakmıştır. 1940'lı yılların ortalarında, böceklere karşı savaşta yaygın olarak kullanılan pestisitlerin sayısı ve kompleksliği hızla artmıştır. İnsektisit olan diklordifenil trikloretan (DDT) ve heksaklorsikloheksan (HCH) ile hormon karakterli olan herbisitlerden diklorfenoksi asetik asit (2,4-D) ve 2-metil-4-klorofenoksiasetik asit (MCPA) 1940'lı yılların sonunda kullanılmaya başlanmıştır. Bunları 1950'li yıllarda dieldrin ve aldrin gibi insektisitler takip etmiştir (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

Artan bilinçsiz pestisit kullanımına ve çevrede oluşturduğu risklere ilk kez Rachel Carson 1962’de yazdığı ‘‘Sessiz İlkbahar’’ (The Silent Spring) adlı kitabıyla eleştirel bir bakış açısı getirmiştir. Carson kitabında; sınırsız pestisit kullanımına ilk kez tüm boyutlarıyla dikkatleri çekerken özellikle DDT, dieldrin ve aldrin gibi organoklorlu pestisitlerin kuşlar ve balıklar üzerindeki olumsuz etkilerini vurgulamıştır. Kitapta, DDT’ye karşı direnç gelişimi, hedef olmayan türler üzerinde olumsuz etkileri, canlıların yağ dokularında birikimi gibi konulara değinilmiştir. Özellikle o dönemde kullanımı yaygın organoklorlu bir insektisit olan DDT’ nin çevre ve toplum sağlığı üzerine etkilerinin bilimsel ve duyarlı bir dille anlatıldığı kitap, kamuoyunda büyük yankı uyandırmış, bilimsel anlamda da çevre hareketi açısından da hak ettiği yeri almıştır. Kitap pestisitle ilgili çalışmalarda sıklıkla refere edilmiş ve yayınlanmasından kısa bir süre sonra da Amerika’da DDT kullanımı yasaklanmıştır. (Carson, 1962; Yıldız vd., 2005; Ağar vd., 1991)

The Guardian gazetesinde çevre başkanı olan Damian Carrington, 31 Ocak 2013 tarihinde yayınladığı köşe yazısında, arı popülasyonlarının azalmasına neden olan ve dünyada en yaygın kullanılan üç neonikotinoid insektisit (klothianidin, imidakloprid ve thiametoksam) kıta çapında kullanımının Avrupa Birliği tarafından yasaklanacağını belirtmiştir (Anonim, 2013a). 2006-2007 yıllarında Amerika Bileşik Devletleri’nde New York’tan Kalifornia’ya kadar 27 eyalette 2.5 milyon arı kovanından en az 600 bininde görülen ve koloni yıkım sendromu olarak adlandırılan arıların ani yokoluşunda bu insektisitlerin etkisi olduğu rapor edilmiştir. Başlangıçta arıları da kapsayan birçok yararlı böcek için düşük toksisiteye sahip olduğu düşünülen neonikotinoidler ile (böcek başına 5 ve 4 ng) kontamine olmuş polen ve nektarların bile potansiyel bir toksisiteye sahip olduğu güncel yayınlar tarafından ileri sürülmektedir. Bu düşük düzeydeki maruziyetler (DDT’den 10.000 kat daha kuvvetli) en önemli polinatör grubu canlı olan arıların nektar arama-bulma, çiçeklerin lokasyonlarını öğrenme-hatırlama ve muhtemelen yuva ya da kovanlarına dönüş yollarını bulma yeteneklerini kaybetmelerine neden olduklarından, Avrupa Gıda Güvenliği Kurumu’nun bilimsel raporuna göre neonikotinoidler arılar için ‘‘yüksek akut riskler’’ olarak tanımlanmıştır ve üç neonikotinoid insektisit (klothianidin, imidakloprid and thiametoksam) kullanımını kıta çapında 1 Ocak 2013 itibariyle sınırlandırılmıştır (EFSA, 2013; Goulson, 2013; Hopwood, 2012). Başlıca pestisit tiplerine ait gelişim ve uygulama kronolojisi Çizelge 1.2.’de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Pestisit gelişim ve uygulama kronolojisi (Ongley, 1996).

Dönem	Örnek	Kaynak	Özellik
1800-1920	İlkin organikler, nitro-fenol, klorofenol, kreozot, naftalin, petrol yağları	Organik kimya, kömür gazı üretimi yan ürünleri, vs	Genellikle özgülüğü düşüktür ve kullanıcı ya da hedef dışı organizmalar için toksiktir
1945-1955	Poliklorlu organikler (DDT, HCCH, Dieldrin, Aldrin, Lindane, Endin), klorlu siklodien	Organik sentez	Kalıcı, iyi seçicilik, iyi tarım özellikleri, iyi bir halk sağlığı performansı, dayanıklılık, zararlı ekolojik etkileri
1945-1970	Kolinesteraz inhibitörleri, Organofosfatlar (parathion, malathion, mevinfos) karbamatlar (aldikarb, karbaril, baygon)	Organik sentez, iyi yapı-etki ilişkileri	Düşük kalıcılık, bazı kullanıcı toksisitesi, bazı çevre sorunları
1970-1985	Sentetik piretroitlerden avermektinler, juvenil hormon taklitçileri, biyolojik pestisitler	Rafine edilmiş yapı etki ilişkileri, yeni hedef sistemler	Eksik seçicilik, direnç, yüksek maliyet ve değişken kalıcılık
1985-1990	Genetiği değiştirilmiş organizmalar, Biyopestisitler, Doğal predatörler, Feromonlar	Faydalı bitki ve hayvanlara ve diğer organizmalara biyolojik pestisit üretimi için gen transferi. Pestisitlerin hedef dışı etkilerine dirençlilik için genetik çeşitliliğe sahip bitkiler	Mutasyonlarla ilgili olası problemler, mikrobiyal ekolojideki bozulmalar, ürünlerdeki tekelleşme
1990-	Tarım zararlıları mücadele teknikleri, Doğal predatörler, Organik tarım	bitki nöbetleşmesi, yeşil gübre, kompost, "biyolojik zararlı kontrolü", toprak üretkenliğini sağlamada mekanik işleme	Ekosistem ve doğal yaşam için daha az tehlikeli

1.2.2. Pestisitlerin Kirliliğe Neden Olma Yolları

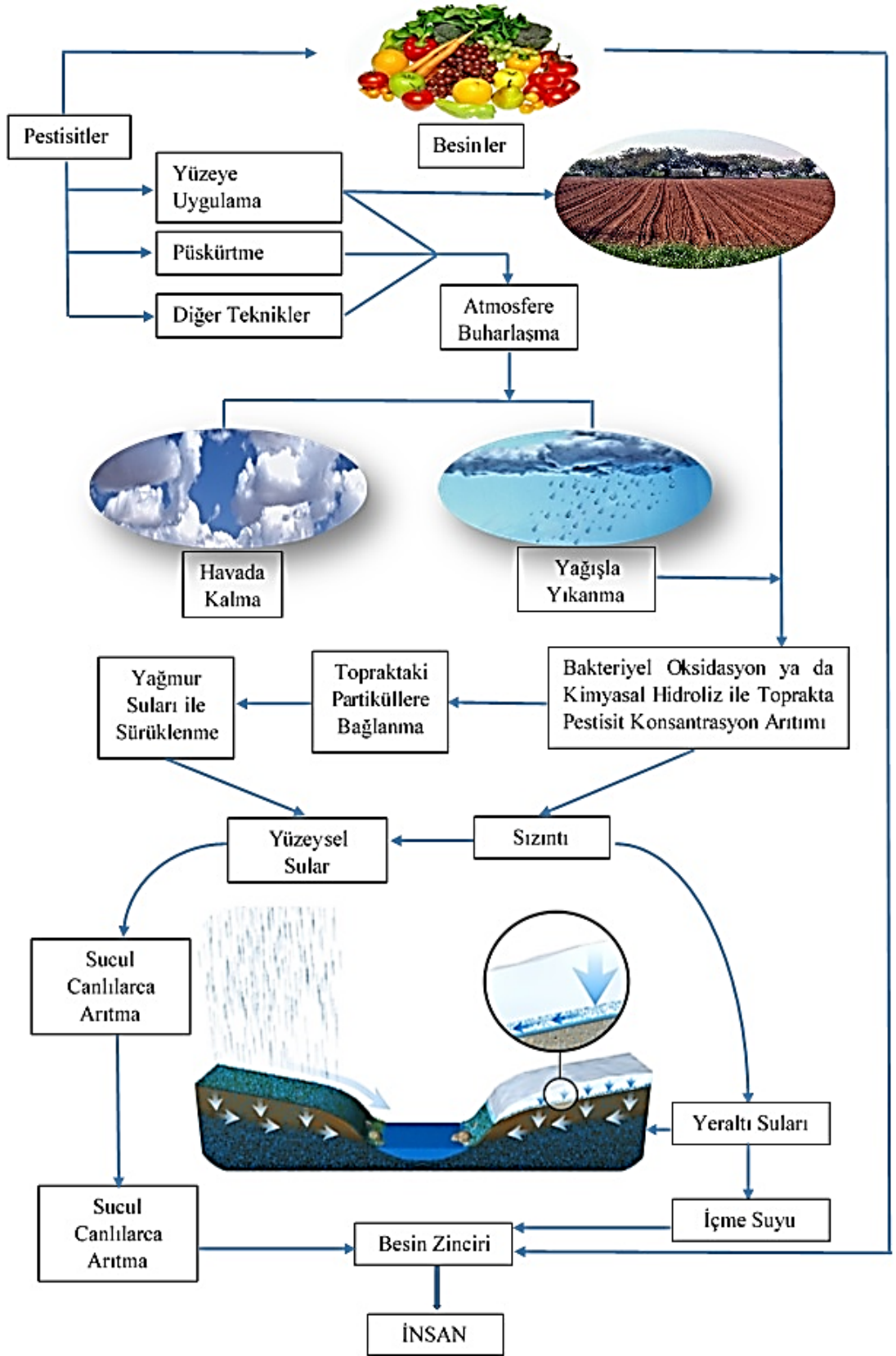
Pestisitlerin kirliliğe neden olma yolları; yüzey ve yer altı sularına direkt bulaşma, toprağa bulaşma, hedef dışı organizmalara doğrudan bulaşma, kalıntılar ya da kalıcı bileşikler nedeniyle hedef dışı organizmalara ulaşma şeklinde olmaktadır. Pestisit uygulamalarında kullanılan miktarın %0.1'den az bir bölümü hedef organizmaya ulaşırken, diğer bölümü ekosisteme karışmakta ve ekosistemde süregelen dengelerin bozulmasına neden olmaktadır (Yıldız vd., 2005) .

Pestisitlerin taşınımı ve yeraltı sularına karışmasında en önemli etken, kimyasal ve fiziksel özellikleridir. Pestisitlerin stabilitesi ve diğer fiziksel özellikleri, hayvan türlerine olan zararı belirler. Maddenin yağda çözünürlük derecesi, toprak tarafından tutulması ve hayvanlardaki birikimini belirleyen faktörlerden biridir. Suda çözünürlüğü ve buharlaşma yeteneği yüksek olan pestisitler kolaylıkla su döngüsüne girebilmekte, çözünürlüğü düşük ve yarı ömürleri yüksek olan pestisitler ise toprak

partiküllerine tutunarak uzun süre kalabilmekte ve zamanla bu çevrelerde birikmektedirler (Tosun vd., 2001; Tiryaki ve Temur, 2010). Pestisitler toz halinde uygulandıklarında, özellikle rüzgârlarla taşınırlar. Uygulama yüksekten olursa çok küçük partiküller halinde havada asılı kalarak çok uzaklara taşınabilirler. Eskimolarda, kuzey kutbundaki ayıbalıklarında ve Güney kutbundaki Adelaide penguenlerinde bile pestisit varlığı belirlenmiştir. Bu durum rüzgâr ve su ile pestisitlerin taşınmasının bir sonucudur (Şekil 1.1.), (Newson, 1967; Woodwell, 1967; Ueda, 1971).

1.2.3. Pestisitlerin Ekolojik Dengeye Etkileri

Bazı pestisitler, kalıcı veya parçalanmaya dirençli özellikte olmaları nedeniyle, aşırı ve sürekli kullanılmaları durumunda, ekosistemin biyotik ve abiyotik bileşenlerinde ekosisteme girdikleri andan itibaren giderek artan miktarlarda akümüle edilirler. Beslenme yoluyla canlıdan canlıya geçerek besin zincirinin en tepesindeki insanlara kadar ulaşırlar ve bunun sonucunda en fazla birikimi insanlarda yaparlar (Şekil 1.1.). Bazen insan ve hayvanlarda meydana gelen bu birikim, tek dozda bile akut olarak zehirleyebilecek miktarın çok üzerine çıkabilmektedir (Serrano vd., 2004).



Şekil 1.1. Pestisitlerin doğadaki döngüsü (Güler ve Çobanoğlu, 1997).

Kalıcı olmaları nedeniyle özellikle organik klorlu insektisitler, su, yağmur suları veya havadaki yoğunluğunun milyonlarca katına varan miktarlarda insanların ve hayvanların yağ dokularında birikirler (Ayas vd., 1996). Ekosistemin hassas dengesi üzerinde en fazla etkiye sahip olan pestisit, aşırı kullanımından dolayı DDT olmuştur. Zararlı böceklere karşı savaşım için kullanılan DDT, yoğun kullanıldığı bölgelerde, besin piramidinin en tabanındaki canlıdan en tepesindeki canlıya doğru giderek artan oranlarda birikim yapmış ve bunun sonucunda deniz ve göllerdeki fitoplanktonların fotosentez yapmalarını engelleyerek birincil üretimi düşürmüş ve besin zincirinde üstlerde bulunan yırtıcı kuşların üremesini engellemiştir. Bu sırada böcek türlerinin hepsi üzerinde etkili olan DDT, savaşım yapılan böcek türüyle beslenen faydalı böcekleri de öldürdüğü için düşmanlarından kurtulan ve DDT'ye karşı direnç kazanan böcek türü daha güçlü bir şekilde çoğalarak daha çok zarar vermeye başlamıştır (Serrano vd., 2004).

Pestisitler, kimyasal yapıları gereği toksik olduklarından, saf olarak zararlılara uygulanmazlar ve ekosistem açısından daha az zararlı, daha emniyetli ve daha ekonomik olacak şekilde bazı yardımcı maddeler ile karıştırılarak kullanılırlar. "Formülasyon" denen bu fiziksel karışım içinde belli bir yüzdede bulunan pestisit, "etkili madde" veya "aktif madde" olarak adlandırılır. Bir formülasyonda bulunması gereken özellikler standart metotlar geliştirilerek FAO ve WHO (Dünya Sağlık Örgütü) tarafından belirlenir ve genellikle aktif madde, yardımcı maddeler, emülgatörler ve dolgu maddelerinden oluşmaktadır (Cecchine vd., 2000).

1.2.4. Türkiye'deki Pestisit Kullanımı

Türkiye'de tarım ilacı tüketimi ortalama 40 bin tondur. Bu miktarın % 47'sini insektisitler, % 24'ünü herbisitler, % 16'sını fungusitler, % 13'ünü de diğer gruplar oluşturmaktadır. Ülkemizde pestisit (zirai ilaç) kullanımı son on yıllık süreçte 54 bin tondan %27 oranında azalarak 40 bin tona düşmüştür (Çizelge 1.3.) (Canik, 2012). Bu pestisitlerin yıllık satış tutarı da yaklaşık 230-250 milyon dolardır. Türkiye'de 2008 yılı sonu itibariyle 4100 adet ruhsatlı bitki koruma ürünü bulunmaktadır. Ülkemizde ruhsatlı etkili madde sayısı ise 418 adettir. Ancak AB mevzuatı uyum çalışmaları kapsamında olumsuz özellikleri nedeniyle, 01.01.2009 tarihi itibariyle 75 adet, 31.08.2009 tarihi itibariyle de 49 adet pestisit in imalatı ve ithalatı durdurulmuştur (Tiryaki ve Temur, 2010). Şu anda, Türkiye'de ilk kez

ruhsatlandırılacak olan tarım ilaçları için kullanılan aktif maddenin AB veya G-8 ülkelerinde ruhsatlı olması şartı aranmakta, böylelikle toksikolojik riskler azaltılmaktadır. İnsan sağlığı için risk taşıyan tarım ilaçları AB ile uyumlu olacak şekilde kullanımdan kaldırılmış olup, ülkemizde bugüne kadar 181 adet pestisit yasaklanmıştır (Anonim, 2013b). Günümüzde çevre bilincinin artması ile insan sağlığının, çevrenin ve biyolojik çeşitliliğin korunması tüm çalışmalarda ön plana çıkmıştır. Bu nedenle başta biyolojik mücadele olmak üzere, kimyasal mücadeleye alternatif yöntemlere ve tüm yöntemlerin bütünleşmesine, diğer bir ifade ile entegre mücadeleye daha çok önem verilmeye başlanmıştır (Altıkat vd., 2009).

Çizelge 1.3. Türkiye'de pestisit tüketim miktarları (kg/L) (Canik, 2012).

YILLAR	İNSEKTİSİT	FUNGUSİT	HERBİSİT	AKARİSİT	RODENSİTİSİT	DİĞER	TOPLAM
2001	-	-	-	-	-	-	51.209.739
2004	-	-	-	-	-	-	41.223.053
2005	-	-	-	-	-	-	43.362.627
2006	7.628.215	19.899.724	6.955.585	901.999	2.877	9.987.399	45.375.799
2007	21.045.632	16.706.631	6.668.653	966.488	50.925	3.277.315	48.715.644
2008	9.250.719	17.862.861	6.176.508	737.123	351.095	5.613.346	39.991.651
2009	9.913.897	17.395.950	5.960.852	1.532.728	77.610	2.302.300	37.183.337
2010	7.175.831	17.545.584	7.451.591	1.039.739	147.404	5.343.714	38.703.862
2011	6.119.933	18.123.614	7.406.602	1.061.609	421.426	6.977.775	40.110.958
2012	7.263.617	15.525.122	7.350.997	859.265	246.590	8.766.030	40.011.621

1.2.5. Pestisitlerin Sınıflandırılması

Pestisitler çok değişik şekilde sınıflandırılmaktadırlar. Bu sınıflandırmalarda; kullanıldıkları zararlılar, zararlılara etki şekilleri ile etki maddesi gibi kriterler rol oynamaktadır. Kullanıldıkları zararlı grubu dikkate alınarak etken maddelerine göre pestisitlerin aşağıdaki gibi sınıflandırılmaları yapılmaktadır (Klaassen, 2001):

A) İNSEKTİSİTLER

(Böceklerle karşı)

1. Organoklorlu hidrokarbonlar
2. Organofosfatlar
3. Karbamatlar
4. Piretroid (Tip I ve II)
5. DDT
6. Dihidropirazoller
7. Neonikotinoidler
8. Siklodienler
9. Fenilpirazoller
10. Avermektinler
11. Formamidinler
12. Rotenoidler
13. Nikotin

B) AKARASİTLER

(Uyuz Böcek ve Parazitlere karşı)

1. Halojen ve Oksijenler
2. Amin ve Hidrozin Türevleri
3. Dinitrofenol ve Esterleri
4. Kükürtlümler
5. Organik kalaylılar
6. Diğerleri

C) RODENTİSİTLER

(Kemirgenlere Karşı)

1. Fluoroasetik Asit Türevleri
2. Tiyoüre Bileşikleri
3. Antikoagülantlar
4. Norbormid
5. Çinko fosfid
6. Diğerleri

D) FUNGUSİTLER

(Mantarlara Karşı)

a) Koruyucu Fungusitler

1. Bakırlılar
2. Kalaylılar
3. Kükürtlümler
4. Dithiokarbamatlar
5. Phtalimidler
6. Nitro Bileşikleri
7. Diğerleri

b) Sistematik Fungusitler

1. Anilidler
2. Benzimidazoller
3. Morpholinler
4. Piperazinler
5. Pyrimidler
6. Triazoller
7. Diğerleri

E) HERBİSİTLER

(Yabani Otlara Karşı)

1. Fenoksi Bileşikleri
2. Benzimidazol
3. Pikolinik Asitler
4. Karbamatlar
5. Klorlu Alifatik Asitler
6. Dinitroamin Analin
7. Anilidler
8. Üre Bileşikleri
9. Triazinler
10. Urasiller
11. Nitrofenoller ve Türevleri
12. Glufosinat
13. Glifosat
14. Bipiridil Türevleri

F) MOLLUSİTLER

(Yumuşakçalara Karşı)

1. Metal Tuzları
2. Metaldehit
3. Metiyokarb
4. Diğerleri

G) FUMİGANTLAR

1. Karbon tetraklorid
2. Klorpikrin
3. Hidrojen siyanür
4. Metil bromid
5. Etilen oksit
6. Hidrojen fosfit
7. Diklorvos
8. Diğerleri

H) BİYOPESTİSİTLER

1. Mikrobiyal Pestisitler
2. Biyokimyasal Pestisitler
3. Bitkisel İçerikli Koruyucular

Etki şekillerine göre pestisitlerin sınıflandırılması:

1. Asetilkolinesteraz (kolinesteraz) inhibitörleri
2. Kitin sentezi inhibitörleri
3. Ekdizon agonisti
4. GABA bloklayıcı (-amino bütirik asit inhibitörü)
5. Jüvenil hormon analogu (böcek büyüme regülatörleri)
6. Antikoagülant
7. Glutamin sentetaz inhibitörü
8. Steroit demetilasyon (ergosterol biyosentezi) inhibitörü
9. Protoporfirinojen oksidaz inhibitörü
10. RNA-polimeraz inhibitörü
11. Tiyol reaktantı
12. Protein sentezi inhibitörü
13. Fotosentetik elektron taşıma inhibitörü
14. Mitokondriyal solunum inhibitörü
15. Sodyum kanallarının inhibisyonu
16. Nikotinik aseilkolin reseptörlerinde aktivasyon
17. Lipid sentezinin inhibisyonu
18. Spesifik enzim inhibisyonları
19. Hücre membran yapısını bozucu

1.3. Toksik Etkileri Değerlendirilen Pestisitler

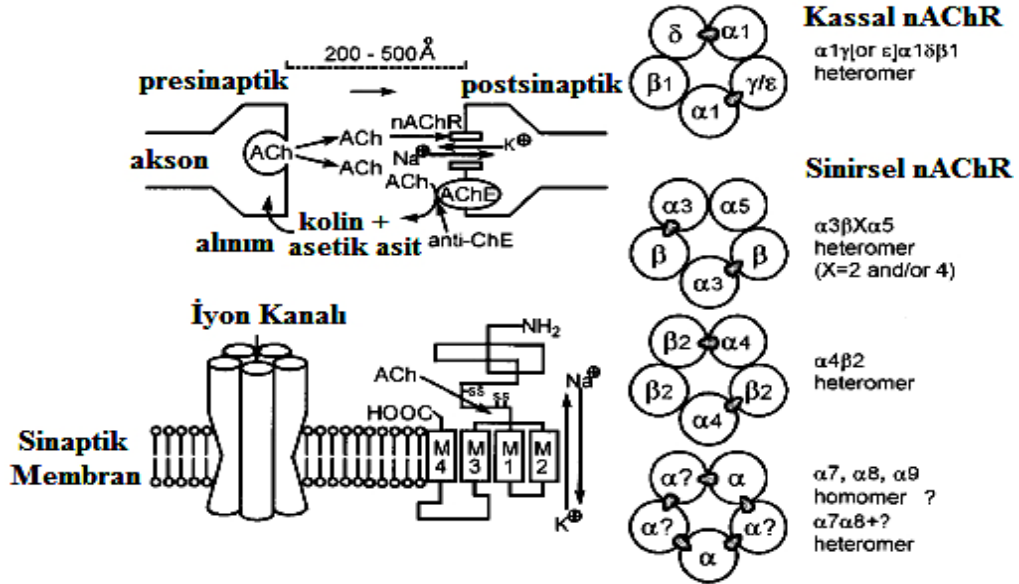
1.3.1. Neonikotinoidler

Neonikotinoidler, yapısal olarak nikotine benzerlik gösteren ve aynı etki mekanizmasına sahip insektisit bileşiklerini kapsamaktadır. Kimyasal yapıları nikotin dışında 6-kloro-3-piridinil grubu, bunların imin metabolitleri ve analoglarından oluşur (Tomizawa vd., 2001a). İsektisit aktivitesi olan ve nAChR (nikotinik asetilkolin reseptörü) agonistlerine analog özelliği taşıyan nithiazin (1970'lerin başlarında Shell tarafından geliştirilmiş nitrometilen grubu bileşik) neonikotinoid insektisitlerin geliştirilmesinde öncü olmuştur (Jeschke ve Nauen, 2008). Agonist, hücre reseptörlerine normalde bağlanması gereken nörotransmitterlere benzer etkinlik gösteren ve fizyolojik aktivitelerini uyaran madde olarak tanımlanır. 1980'li yıllarda geliştirilen neonikotinoidler, son 30 yılda tüm dünyada homopterler, hemipterler ve sifonapterler gibi tarım zararlılarına ve evcil hayvanların dış parazitlerine karşı mücadelede kullanılan ve yüksek seçici toksisiteli olan nöroaktif sentetik insektisitlerin en önemli yeni sınıfıdır. Neonikotinoid insektisitlerin ilki, 1985 yılında Bayer tarafından patenti alınan ve ilk kez ticari olarak 1990'lı yılların başlarında marketlerde satışa sunulan imidacloprid'dir (Goulson, 2013). 2006 yılında neonikotinoid ailesinin dünya genelindeki yıllık satış tutarı 1.56 milyar dolardır ve global insektisit miktarının %17'sini teşkil etmektedir (Jeschke ve Nauen, 2008).

Organofosforlu, organoklorlu, metilkarbamatlar ve piretroidler gibi sentetik insektisitler, doğada ve canlıda yüksek kalıcı olması yani yarı ömürlerinin fazla olması, lipofilik özelliklerinin yüksek olması, parçalandıklarında ana bileşikten daha toksik ürünlere dönüşebilmeleri, dirençli populasyonların ortaya çıkmasında rol oynamaları, hedef olmayan organizmaları etkilemeleri gibi özelliklerinden dolayı yasaklanmaları artmış ve neonikotinoid insektisitler daha geniş kullanım alanı bulmuştur (Tomizawa ve Casida, 2003; Beketov ve Liess, 2008a; Kocaman ve Topaktaş, 2007). Çünkü neonikotinoidler, genellikle böceklere oranla memeli ve kuş gibi homoitermal hayvanlarda ve balıklarda daha düşük akut ve kronik toksisiteye sahiptirler (Tomizawa ve Casida, 2005). Ayrıca, tarım zararlılarında daha az dirençlilik gelişimi meydana getirmektedirler (Puinean vd., 2010). Neonikotinoidlerin suda yüksek çözünürlüğe sahip olmaları ve uçucu olmaları, doğada hareketli olmalarını sağlasa bile kalıcılıklarını kısıtlar ve hedef dışı

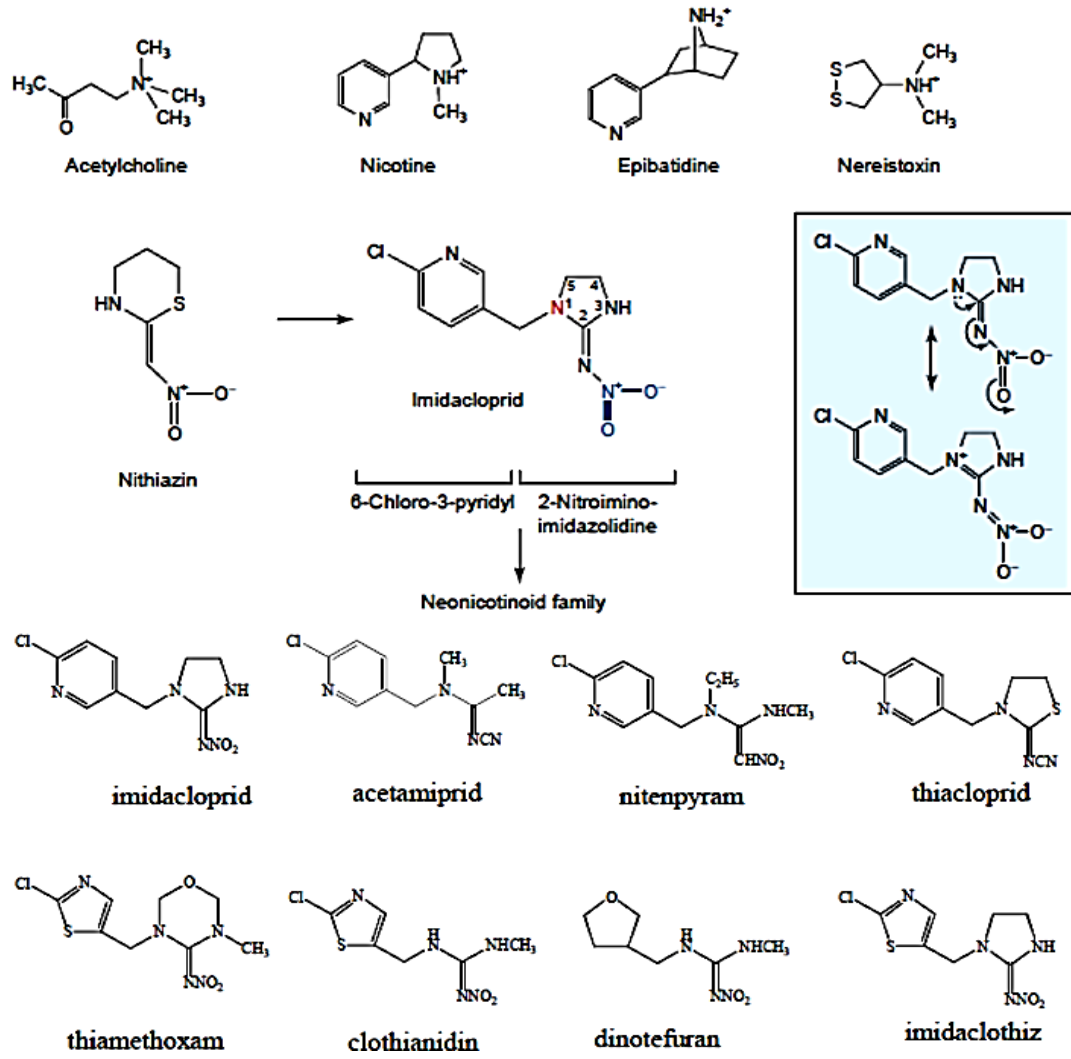
organizmalarda uzun süreli etkilerini azaltır (Barbee ve Stout, 2009). Ancak, potansiyel olarak yüzey sularında birikebilme özelliğine sahip olan neonikotinoidlerin yüksek miktarlarda doğada kullanılmaları, yüzey sularına karışma, birikme ve böylece böcek, kabuklu, amfibi ve balık gibi hedef olmayan sucul organizmalarda toksik etki gösterme olasılığını artırmaktadır (Tişler vd., 2009). Ayrıca, bu insektisit grubunun sucul organizmalar üzerine olan etkileri ilgili çalışmalar oldukça sınırlıdır.

Asetilkolinesteraz enzimi ve voltaj kapılı sodyum kanallarından sonra, insektisitler için en önemli hedef bölgeleri olan nAChR'leri, omurgalılarda beş alt ünitenin ($\alpha 1$ - $\alpha 10$, 1β - 4β , γ , δ , ϵ) çeşitli kombinasyonlarda merkezi bir iyon kanalı etrafında simetrik olarak dizilmesi sonucu oluşan ve yaklaşık olarak 280 kDa moleküler ağırlığa sahip glikoproteinlerdir. (Nauen vd., 1999; Liu vd., 2010) Her bir alt ünite M1, M2, M3 ve M4 olarak adlandırılan dört transmembran proteine sahiptir. M2 alt ünitesi iyon kanalının lümenini astarlar ve iyon kanal blokerleri için bağlanma bölgelerini içerir (Şekil 1.2.), (Tomizawa ve Casida, 2001b, Arias, 1997; 2000; Corringer vd., 2000; Chamaon, 2002).



Şekil 1.2. Omurgalı nAChR'lerinin fonksiyonel yapılanması, çeşitliliği ve kolinerjik sinaps boyunca nörotransmitter iletimi (Tomizawa ve Casida, 2001b).

Neonikotinoid insektisitler, N-nitroguanidinler (imidacloprid, thiametoksam, klothianidin ve dinotefuran), nitrometilenler (nitenpiram) and N-siyanoamidinler (asetamiprid ve thiakloprid) olmak üzere 3 kimyasal grupta sınıflandırılır (Şekil 1.3.), (Watanabe, 2012; Matsuda vd., 2001, Jeschke vd., 2011).



Şekil 1.3. Nikotin ve nitrometilen ($C = CHNO_2$), nitroguanidin ($C = NNO_2$) ve siyanoamidin ($C = NCN$) yan gruplarına sahip neonicotinoid insektisitlerin kimyasal yapıları (Watanabe, 2012; Matsuda vd., 2001).

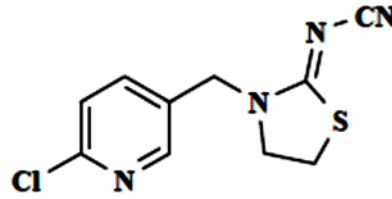
Neonicotinoidler, hem memelilerde hem de böceklerde post-sinaptik membranda bulunan nikotinik asetilkolin reseptörüne (nAChR) bağlanarak agonist etki gösterirler. Böcek ve kuşlar için yüksek toksisiteye sahip olan neonicotinoid insektisitler, memeli ve sucul organizmalarda daha düşük toksisite gösterirler. Fakat bu çalışmada kullanılan ve bir neonicotinoit grubu insektisit olan thiakloprid'in *Xenopus laevis* karşı da toksik olduğu belirtilmiştir (Yamamoto and Casida, 1999; Tomizawa ve Casida, 2003; 2005). Memelilerdeki nAChR'ü yapısal olarak böceklerdekinden çok az farklılık göstermektedir. Bunun nedeni, AChR'lerin yapısal olarak farklı alt ünitelere sahip olmaları ve neonicotinoidlerin nAChR'ler üzerindeki farklı bağlanma bölgelerinden kaynaklanmaktadır. Neonicotinoid insektisitlerin memeli sinir sistemindeki reseptörlere bağlanmaları nAChR'ün $\alpha 4/\beta 2$ yüzeyinde

olmaktadır ve böceklerde de buna benzer bir yüzey bulunmaktadır (Casida ve Quistad, 2004). Postsinaptik nAChR'e neonicotinoitlerin bağlanması sonucu, kolinerjik sinapslarda sinyallerin düzensiz artışına ve bunun sonucunda impuls iletiminin tamamen bloke edilmesine neden olmaktadır. Böceklerde neonicotinoit zehirlenmesinin belirtileri, motor ve lokomotor aktivitelerde azalmalar, düzenli olmayan abdominal titreme, kanatları germe, şiddetli vücut sarsıntısı, halsizlik, koordinasyon bozukluğu, felç ve sonunda ölüm şeklinde gözlenir (Kocaman, 2007).

Neonicotinoit grubu insektisitlerin güvenilirliği, kısmen böceklerin nAChR'leri üzerindeki güçlü etkilerine ve omurgalıların nöronal reseptörleri ile zayıf etkileşimlerine bağlıdır. Neonicotinoid insektisitler üzerinde biyolojik etkiden sorumlu farmakofor adı verilen elektronegatif bir kısım mevcuttur ve böcek nAChR'lerinin özel alt üniteleri tarafından yüksek seçicilikle tanınırlar. İmidakloprid, thiamethoksam, klothianidin ve dinotefuran pestisidlerinde farmakor bölge olarak nitroguanidine kısım; nithiazine ve nitenpyram pestisidlerinde nitrometilen kısım; thiakloprid ve asetamiprid pestisidlerinde ise siyanoamidin kısım görev yapmaktadır. Neonicotinoidlerin omurgalılardaki toksik etkileri, sahip oldukları farmakor bölgeleri ile beyinde bulunan nAChR'lerinin $\alpha 4/\beta 2$ alt ünitelerine bağlanma ilgileri ve uyarıcı etkisi ile karşılıklı ilişkilidir. Neonicotinoid insektisitler ve analoglarının etkileri nAChR alt tiplerine göre değişebilir (Tomizawa ve Casida., 1999; 2000; 2003; 2005; Tomizawa, 2004; Vo vd., 2010). Neonicotinoidlerin biyotransformasyonları büyük ölçüde detoksifikasyon bazı durumlarda ise biyoaktivasyon mekanizmalarını içerir ve ilk olarak oksidasyon ya da redüksiyon tepkimeleri ile başlar. Neonicotinoitlerin biyotransformasyonlarında önemli rol oynayan enzimler, karaciğer mikrozomal CYP450'ler ve sitozolik aldehit oksidazlardır (Kocaman, 2007). Pek çok neonicotinoit metabolik değişimlere maruz kalır ve kalıntı olarak toksik metabolitler oluşturabilir. Fakat bazı durumlarda neonicotinoitlerin kalıntıları ana bileşik de olabilir. Metabolizmaları sonucunda nAChR seçiciliği, bileşiğe bağlı olarak artar veya azalır. Örneğin IMI'nin desnitro metabolitleri (DN-IMI) böcek nAChRleri için detoksifikasyon ürünü iken memeli nAChRleri için aktif türevlerdir (Honda vd., 2006).

1.3.1.1. Thiaklopid

Ticari olarak büyük başarı sağlayan neonikotinoid insektisit ailesinin yeni üyesi Thiaklopid (THI), (Z)-N-{{3-[(6-Chloro-3-pyridinyl)methyl]-1,3-thiazolan-2-yliden}cyanamide (IUPAC), 2003 yılından beri Bayer Crop Science tarafından üretilmektedir. Molekül formülü C₁₀H₉ClN₄S ve molekül ağırlığı 252.73 g/mol'dür. Topraktaki yarılanma ömrü 1-4 gündür ve degradasyonu mikrobiyal yolla olur. Aerobik koşullarda tamamıyla metabolize edilerek hızlı bir şekilde CO₂'e indirgenir. Arazi çalışmaları, uygulamadan yaklaşık 100 gün sonra ana bileşiğin toplam %2'sinin ekstratta kaldığını göstermiştir. YRC 2894 amid (ilk kimyasalın % 74'ünün degradasyonu sonucu oluşan amid türevi) ve YRC 2894 sülfonik asit (ilk kimyasalın % 20'sinin degradasyonu sonucu oluşan sülfonik asit türevi) olmak üzere sadece iki ana metaboliti vardır. YRC 2894 sülfonik asit metaboliti, ana bileşiğe göre daha dirençli ve taşınabilme özelliğine sahiptir. Bu nedenlerden dolayı, thiaklopid, yağmur sonrası yüzey sularını kontamine edebilir (EPA, 2003; Beketov and Liess, 2008b). Thiaklopid, suda oldukça çözünürdür (184-186 mg/L) ve aerobik sucul ortamlarda yarılanma ömrü 10-63 gün; anaerobik sucul koşullarda 1 yıldan fazla; su sediment sisteminde ise 11-27 gündür. Bu nedenle bu kimyasalın dirençli olduğu düşünülmemektedir. Yeraltı sularına ulaşabilme potansiyeli "orta-düşük" olarak kabul edilir (European Commission 2004). Thiaklopid'in moleküler yapısı Şekil 1.4.'de verilmiştir.



Şekil 1.4. Thiaklopid'in moleküler yapısı

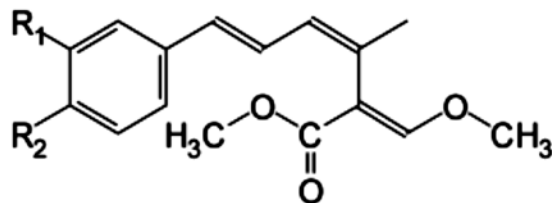
2007 yılında 50'den fazla ülkede tescillendirilmiştir. T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, Gıda ve Kontrol Genel Müdürlüğü'nün yayınladığı istatistiklere göre 2011 yılında saf halde 15,716 kg satışı gerçekleştirilmiştir. Ülkemizde her türlü meyve ve sebze yetiştiriciliğinde kullanımı yaygındır. Diğer bütün neonikotinoid insektisitler gibi thiaklopid de nAChR agonisti olarak sinir sistemine etki eder. Thiaklopid, postsinaptik nörondaki asetilkolin'i (ACh) taklit ederek nAChR'e geriye dönüşümsüz olarak bağlanır ve asetilkolin esterase (AChE) tarafından parçalanmadığı için kontrollü sinaptik iletimin kesilmesine neden olur.

Bunun sonucunda, postsinaptik nöronda ve sinir sisteminde aşırı olarak uyarılmaya, felce ve hatta ölüme neden olmaktadır (Jeschke vd., 2001; Langer-Jaesrich, 2010; Tomizawa ve Casida, 2005).

Neonikotinoidler, fizyolojik pH düzeylerinde protonlanmamış olduklarından, omurgalıların nAChR'lerine daha az ilgi duyarlar ve düşük akut ve kronik toksisite göstermektedirler. Ancak, şimdiye kadar araştırması yapılmış neonikotinoidler arasında thiaklopridin balıklar için nispeten yüksek düzeyde toksisite sergilediği bulunmuştur. 96 saatlik thiakloprid uygulamaları sonucu *Danio rerio*'da LC₅₀ değeri 19.7 mg/L bulunurken, *Oncorhynchus mykiss*'de 30.5 mg/L olarak rapor edilmiştir (Schmuck, 2001; Osterauer ve Köhler 2008).

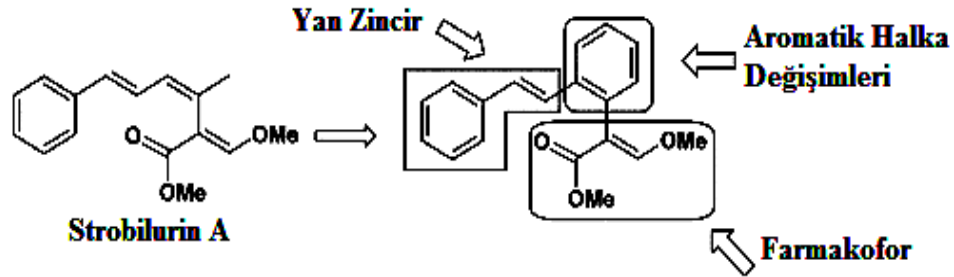
1.3.2. Strobilurinler

Strobilurinler, etki biçimleri yeni geliştirilmiş tarımsal fungusitlerin önemli bir sınıfıdır. İsimleri, *Strobilurus* cinsi mantarlardan gelmektedir. Strobilurinlerin gelişimine β -metoksiakrilik asidin doğal fungusidal türevleri öncülük etmiştir. En basit örnekleri, Strobilurin A, oudemansin A ve mikсотiyazol A'dır. Doğal strobilurinler, *Basidiomycetes* sınıfına ait *Oudemansiella mucida* ve *Strobilurus tenacellus* türlerinde tanımlanmıştır. Bu türlerin sıvı kültürlerinden izole edilmiş olan bu ürünler, funguslarda şikimik asit döngüsü aracılığıyla fenilalaninden sentez edilirler. Bu kimyasalların çoğu, üretildikleri organizmaların varlıklarını sürdürebilmeleri için gereklidir. Doğal strobilurinler, maya ve filamentli funguslara karşı oldukça aktif iken, bakterilere karşı inaktiftirler. Bu bileşikler, yapılarındaki konjuge alken kısmından dolayı fotodegradasyona uğrayabilen nispeten zayıf fungusitlerdir. Buna rağmen, ticari olarak tarımsal uygulamalarda kullanılacak daha istikrarlı ve daha güçlü sentetik fungusitlerin geliştirilmesine öncü olmuşlardır (Balba 2007; Bartlett vd., 2002).



Şekil 1.5. Strobilurinlerin temel yapıları.

Bütün doğal strobilurinler, methyl (E)-3-methoxy-2-(5-phenylpenta-2,4-dienyl) acrylate yapısını taşırlar (Şekil 1.5.). Çeşitliliği, 3. ve 4. pozisyondaki aromatik halka değişimleri sağlamaktadır. Yapı ile aktivite arasındaki önemin anlaşılması, öncül moleküllerde optimizasyon çalışmalarını başlatmıştır. İstikrarlı olmayan zayıf yan zincirlerin daha istikrarlı ve güçlü yan zincirlerle modifikasyonu, çeşitli sentetik strobilurin analoglarının geliştirilmesine yardımcı olmuştur. Sentetik strobilurinler, yan zincir modifikasyonu ile geliştirilmiş fotostabilite özelliği kazandığından, β -methoxyacrylate farmakoforu sayesinde doğal strobilurinler gibi biyolojik aktivite gösterirler (Şekil 1.6.) (Hüter, 2011).



Şekil 1.6. Sentetik strobilurin analoglarının sentezine öncülük eden yan gruplar.

Geniş spektruma sahip çevre dostu strobilurin fungusitler, yenilikçi etki modu, yüksek seçici toksisiteleri ve verimi artırmadaki performansları ile diğer fungusitlere göre önemli avantajlar sağlarlar. Satışları ilk kez 1996 yılında azoksistrobin ile başlayan strobilurin grubu fungusitler, 5 yıl içerisinde ortalama %15.7 oranında büyüme göstermiş ve 2007 yılında dünya genelindeki yıllık satış tutarı 1,636 milyar dolara ulaşmıştır. Gelişimlerinden 20 yıl sonra 16 strobilurin içeriği piyasaya sunulmuştur ve küresel ürün korumanın hizmetine sunulmayı bekleyen strobilurin tabanlı ürünler ile strobilurin-karışım ürünleri daha fazla kayıt kazanmıştır (Barlett vd., 2002).

1.3.2.1. Strobilurinlerin Etki Mekanizması

Strobilurinler, mitokondri iç membranında bulunan ve elektron taşıma sisteminin bir elemanı olan sitokrom *bc₁* enzim kompleksinin (Kompleks III: integral membran protein kompleksi) kinol (ubikinol) oksidasyon (Q_0) bölgesine bağlanarak sitokrom *b* ve sitokrom *c₁* arasındaki elektron transferini bloke eder. Redükte NADPH oksidasyonunu ve ATP sentezini engelleyerek funguslarda hücresel solunumu sekteye uğratar. Enerji üretiminin durması, fungusun ölümüne neden olur. Strobilurinler, fungal spora misellerden daha duyarlıdır. Bu sınıfa ait kimyasallar,

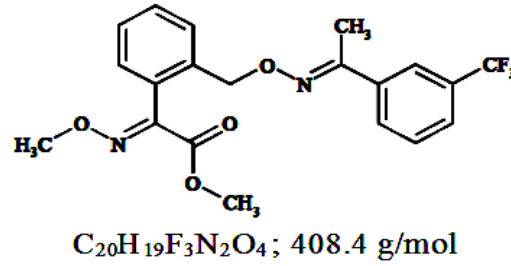
fungisidal etkilerini, hızlı bir şekilde fungal yaşam döngüsünün ilk basamağı olan sporların çimlenme aşamasında gösterirler (Bartlett vd., 2002; Balba 2007; Fernández-Ortuño vd., 2010).

Sentetik strobilurin fungusitler, genellikle düşük toksisiteye sahip olduklarından, sınırlı dozlarda kuşlar, memeliler ve arılar için toksik değildir. Ruhsatlandırma için gerekli standart laboratuvar çalışmalarına göre strobilurinler, sucul canlılar için farklı toksisiteye sahiptirler. Sentetik strobilurin türevlerinde metominostrobinden azoksistrobin, kresoksim-metil, pikoksistrobin, trifloksistrobin ve piraklostrobine doğru gidildikçe sucul organizmalar için artan toksisite gösterdikleri ve bunun sebebinin artan lipofilik özelliklerinden kaynaklandığı bildirilmiştir. Yüksek lipofilik özelliğe sahip bileşikler, sucul canlılar tarafından büyük ölçüde alınır ve benzer toksisiteye sahip düşük lipofilik özellik gösteren bileşiklere göre daha toksiktirler. Balıklarla yapılan akut toksisite çalışmalarında, etki süresinin çok kısa olduğu ve bütün toksisitenin birkaç saat içinde gerçekleştiği ve sonrasında ise artış göstermediği belirlenmiştir (Barlett vd., 2002).

1.3.2.2. Trifloksistrobin

Trifloksistrobin (TFS), methyl (*E*)-methoxyimino-{(*E*)-a-[1-(a,a,a-trifluoro-*m*-tolyl)ethylideneaminoxy]-*o*-tolyl}acetate (IUPAC), 2000 yılından beri Bayer Crop Science tarafından üretilmektedir (Şekil 1.7.). TFS, suda çözünürlüğü 0.61 mg/L'dir ve sıcaklığa bağlı olarak nötralden alkaline kadar birçok pH aralığında hidrolize olur. Bu kimyasalın suda degradasyonu temel olarak biyolojik ve fotolitik süreçler sonucu meydana gelmektedir. Trifloksistrobin (TFS)'in, kuşlar, memeliler, arılar, diğer yararlı böcekler ve toprak solucanları için toksik olmadığı düşünülmektedir. Ancak, hedef olmayan sucul canlılar için yüksek düzeyde toksisiteye sahiptir. Örnek olarak, TFS'nin *Bufo cognatus* iribaşları için LC₅₀ değeri 40 µg/L olarak belirlenmiştir (Belden vd., 2010). Bir tatlı su balığı olan *Oncorhynchus mykiss*'in TFS'ne 96 saatlik maruziyeti sonucu, ortalama letal konsantrasyon (LC₅₀) aralığı 15-78 µg/L iken, bir deniz kabuklusu olan *Mysidopsis bahia* için ortalama etkili konsantrasyon (EC₅₀) aralığı 9-34 µg/L olarak bulunmuştur (APVMA, 2000). TFS, sucul ortamlarda seyrek olarak bulunur (Battaglin vd., 2010). Su ve toprakta hızlı yıkıldıklarından, çevredeki yarılanma ömürleri suda 2, toprakta 15-55 gündür. TFS, degradasyon sonrası birinci dereceden asit metabolitine (CGA-

321113) ve bir seri izomere dönüşür. Uygulama sonrası TFS'nin yaklaşık % 80'i, temel metabolit olan CGA-321113 dönüşür. Topraktaki yarılanma ömrü 301 gün olan CGA-321113, suda çözünür (30,9 ppm) ve taşınabilir özelliğe sahiptir. Yer altı sularına ulaşabilme potansiyeli olan bu metabolit, hidrolize dirençlidir ve yaklaşık 1 m derinlikteki toprak profilinde tespit edilmiştir. Sucul organizmalar, yüzeye püskürtme, atmosferik taşınım, yağmur suları ve uygulama sırasında arazi üzerinde bulunan hayvanların hareketleri gibi yollarla taşınarak, TFS'in suda çözünür bir metaboliti olan [(E,E)-trifloksistrobin asit]'e maruz kalabilirler (Banerjee vd., 2006; EPA, 2002).



Şekil 1.7. Trifloksistrobinin moleküler yapısı.

1.4. Biyoindikatörler

Her türlü insan faaliyetleri sonucu ortaya çıkan metal ve pestisit gibi ksenobiyotiklerin etkileri ve neden oldukları maruziyetin çeşitli moleküler yaklaşımlar kullanılarak ölçülebilmesi nedeniyle biyoindikatörler (biyolojik gösterge) büyük önem arz etmektedir (Kazancı ve Girgin, 1998; Gadzała-Kopciuch vd., 2004). Biyoindikatörler, bir ekosistemdeki organizma ve organizma birlikteliklerinin sağlık durumunu değerlendirmeye ve ekosistemlerindeki bir problemin göstergesi olan değişimlerin belirlenmesine yardımcı olur ve oluşan bu yanıtlar çevresel riskleri önlemek için erken bir uyarı sistemi oluşturur. Biyolojik yanıt, moleküler, hücresel ve fizyolojik yanıtlardaki farklılıklardan davranış değişikliklerine kadar olan tüm değişimleri kapsar. Çoğu zaman toksik madde(ler)in miktarı ile söz konusu yanıt arasında doğrusal bir ilişki vardır (Karaca, 2010).

Moleküler, hücresel ve hatta tüm canlı gibi çeşitli biyoindikatör modelleri bulunmakta olup, bazıları kirleticilere spesifik, bazıları ise kirlilik ve doğal stress kaynaklarının durumuna göre cevaplarında değişiklik göstermektedir (Kenan, 2007).

Biyoundikatör kullanılması en önemli nedeni, kirleticilerin biyolojik etkileri hakkında bilgi vermesidir. Biyoundikatörler kirleticilerin toksik etki mekanizmalarının anlaşılmasını sağlarlar. Çoklu biyoundikatör yanıtlarının taranmasıyla, organizmanın toksik maddeye maruziyeti ve sonuçları hakkında önemli bilgiler elde edilebilmektedir (Karaca, 2010).

Biyolojik indikatörler üç temel gruba ayrılmaktadır (Kazancı ve Girgin, 1998):

1. İndikatör tür veya belirtici tür: İndikatör tür, ekolojileri bilinen türler olup ekosistemde azalmaları veya çoğalmaları ekosistem üzerine bir çok etmenin (iklim değişikliği, çeşitli kirleticilerin ortama karışması gibi) baskısını gösterir.

2. Biyomonitörler: çevrelerinden belli bir süre içinde belli toksinleri vücuda alan ve dokularında biriktiren bitki ve hayvan türleridir. Bu türlerin ortamdaki varlıklarının saptanması ile pasif olarak kullanımları ortamın koşulları hakkında bilgi verir. Hassas ve biriktirici biyomonitörler olmak üzere ikiye ayrılır.

3. Test Organizmaları: Bunların ekosistem çalışmalarında kullanımları sınırlıdır. Test organizmaları ile yapılan deneylerle bu organizmaların belli maddelerle birlikte aynı ortamda bulunabilmeleri deneyerek çeşitli testlerin standardizasyonu sağlanır.

Biyoundikatör olarak kullanılacak organizmalar; bakteriler, protozoalar, bentik algler, likenler, çeşitli omurgasızlar, makrofitler, amfibiler, balıklar ve kuşlardır (Kazancı ve Girgin, 1998).

1.4.1. Sucul Ekosistemlerin Biyoindikatörü Olarak *Xenopus laevis*

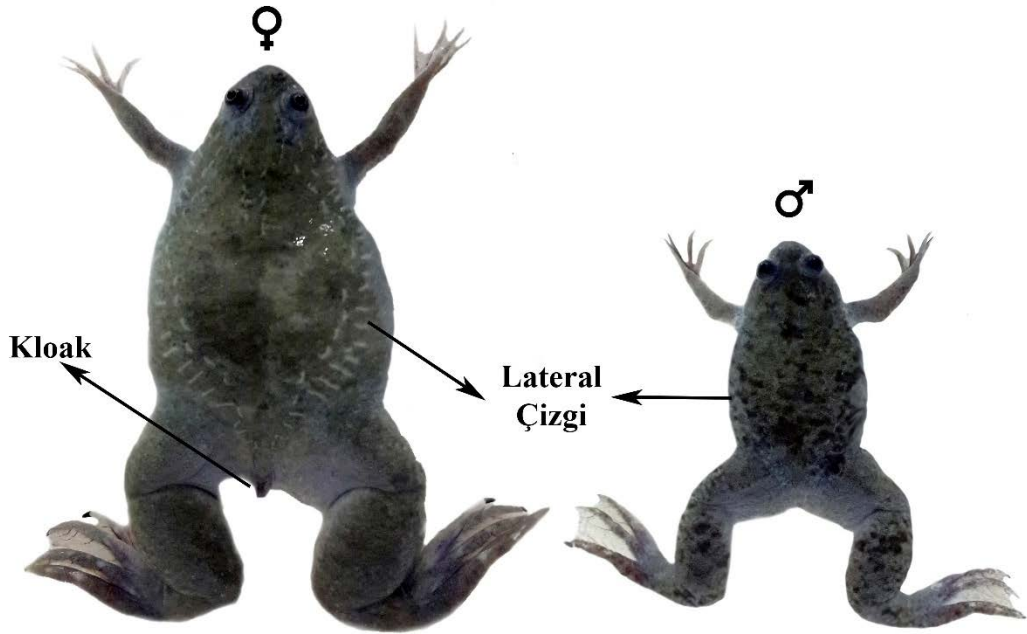
1.4.1.1. *Xenopus laevis*

Dünya çapında yaklaşık 7113 türle dağılım gösteren amfibilerin 6274 türü Anura (kuyruksuz kurbağa) ordosuna aittir. Dünya Koruma Birliği, tehdit altındaki amfibi türleri %30.5 olarak listelemiştir. Buna neden olan mevcut koşulların devam etmesi durumunda bu sayının giderek artacağı düşünülmektedir. Bu nedenle, dünya çapında birçok bilim adamı, son yirmi yılda azalan amfibi popülasyonunun endişe verici olduğunu belirtmişlerdir. Amfibi azalışındaki asıl nedenlerden birinin, pestisitlerden kaynaklandığı düşünülmektedir. Amfibiler birçok yolla pestisitlere maruz kalabilirler. En yaygın maruz kalma yolu, tarımsal aktivitelerdir. Doğal habitat, araziyi korumaya yönelik yapılan tarımsal uygulamalar, zirai ilaçlama nedenli kirlenme ve artan kimyasal parçalanma gibi çeşitli yollarla etkilenebilir. Doğal kurbağa popülasyonları üzerine yapılan biyoizleme çalışmalar popülasyon azalışı ile tarım arazilerine yakınlık arasında ilişki olduğunu göstermektedir. Özellikle, sulak alanların kıyı bölgelerinde yaşayan metamorfoz sonrası amfibi grupları pestisitlere maruz kalabilirler (Güngördü, 2013).

Güney Afrika tırnaklı kurbağası, *Xenopus laevis*, 1802 yılında Fransız doğa bilimci ve zoolog Francois Marie Daudin tarafından teşhis edilmiş ve “düz kara kurbağası” olarak tanımlanmıştır (Şekil 1.8.) (Green, 2010). Türün tanımlanmasından bugüne kadar, çeşitli adlar verilmiştir. Daudin, derisinin yumuşak olması ve kara kurbağasına benzemesinden dolayı, bu hayvana latince *Bufo laevis* adını vermiştir. *Xenopus* anatomisinde daha sonra yapılan çalışmalar, Pipidae olarak bilinen dilsiz kurbağa ailesine ait olduğunu göstermiştir. Deri yapısı bakımından su kurbağasına, çiftleşme özelliği bakımından kara kurbağasına benzeten *Xenopus*, genellikle Güney Afrika tırnaklı kara kurbağası olarak adlandırılrsa da bunun kara veya su kurbağası olup olmadığı halen tartışmalıdır. Garip ayak anlamına gelen *Xenopus* adı ilk kez Wagler (1827) tarafından verilmiştir. Bu türün üreme habitatlarına ait ilk bilgiler, 1890 yılında bu hayvanı ilk kez doğal ortamında inceleyen J.M. Leslie tarafından verilmiştir. İlk kez Beddard (1894) tarafından *Xenopus*'da yumurta dökme ve iribaş oluşumu gözlenmiştir. 1913 yılında ise Dreyer tarafından *Xenopus* anatomisine (gerek ergin gerek larva) ait ilk ayrıntılı incelemeler yapılmıştır. Bu sayede, takip eden 30 yıl boyunca Avrupa ve Kuzey Amerika'daki

laboratuvarlarda *Xenopus*'un yaygın bir şekilde kullanımı sağlanmıştır. 1930 ile 1960 yılları arasında biyoloji, endokrinoloji ve biyokimya dallarının gelişimine yönelik önemli bir hayvan modeli haline gelmiştir. 1940'larda, hamilelik testi aracı olarak hastanelerde yaygın bir şekilde kullanılmıştır. 1980'li yılların başlarında, çevresel kirleticiler ile diğer maddelerin embriyonik mortalite, gelişim hızı ve malformasyon üzerine etkilerinin değerlendirilmesinde rol oynayan FETAX (Frog Embryos Teratogenesis Assay: *Xenopus*-Kurbağa Embriyosu Teratojenite Deneyi: *Xenopus*) standart laboratuvar sistemi geliştirilmiştir. Bugün *Xenopus*, embriyoloji, toksikoloji, hücre biyolojisi, fizyoloji, biyokimya ve biyomedikal çalışmalarında yaygın olarak kullanılan omurgalı hayvan modelidir (Green, 2010).

Biyolojisi iyi bilinen *Xenopus*, dünyanın her yerinde laboratuvar koşullarına iyi adapte edilmiş olan bir amfibi türüdür. Genellikle embriyoları ve iribaşları, teratojenite ve gelişim inhibisyonu ile ilgili toksikolojik araştırmalarda yaygın olarak kullanılan bir test organizmasıdır (Prati vd., 2000). Bu kurbağa türü kullanılarak çeşitli çevresel kirleticilerin, canlıların gelişim evreleri üzerindeki etkileri test edilebilmekte ve aynı zamanda sucul ekosistemler üzerinde kirleticilerin etkileri değerlendirilebilmektedir (Olivera vd., 2008).



Şekil 1.8. *Xenopus laevis* türü kurbağalara ait dişi (♀) ve erkek (♂) bireyler.

1.4.1.2. *Xenopus laevis* Sistematığı

Güney Afrika'nın güney ucundan kuzeydoğusuna kadar uzanan ve Sahra altı Afrika bölgesi olarak da adlandırılan coğrafik alanda yayılım gösteren *Xenopus laevis*'in sistematığı aşağıda gösterilmiştir (Birhanlı, 2003; Anonim, 2013c).

- Domain** : *Eukaryota* - Whittaker & Margulis, 1978
Alem : *Animalia* - C. Linnaeus, 1758
Alt alem : *Bilateria* - (Hatschek, 1888) Cavalier-Smith, 1983
Branş : *Deuterostomia* - Grobber, 1908
İnfracım : *Chordonia* - (Haeckel, 1874) Cavalier-Smith, 1998
Şube : *Chordata* - Bateson, 1885
Alt şube : *Vertebrata* - Cuvier, 1812
İnfracım şube : *Gnathostomata* - Jawed
Süper şube: *Tetrapoda* - Goodrich, 1930
Sınıf : *Amphibia* - Gray, 1825
Alt sınıf : *Lissamphibia* - Haeckel, 1866
İnfracım sınıf : *Lissamphibia*
Takım : *Anura* - (Fischer von Waldheim, 1813) Gray, 1825
Alt takım : *Archeobatrachia*
Süper aile : *Pipoidea*
Aile : *Pipidae* - Gray, 1825
Alt aile : *Xenopodinae*
Cins : *Xenopus* - Wagler, 1827
Tür adı : *Xenopus laevis* (Daudin, 1802)

1.4.1.3. *Xenopus laevis*'in Morfolojisi ve Anatomisi

Diğer kurbağa türleri ile karşılaştırıldıklarında, *Xenopus*, dorsaventral yassı olup, koyu tenli (yeşilimsi-sarı-gri) bir gövdeye sahiptir. Arka bacaklar çok uzun olup, parmakları arasında zar bulunmaktadır ve 5 parmaktan sadece üçünde besin parçalamaya, çamurdaki böcekleri çıkarmaya, estivasyon sırasında çamuru kazmaya yarayan siyah tırnaklar bulunmaktadır. Daha kısa ve perdesiz olan ön ayaklar, besinin ağıza yönlendirilmesinde ve çiftleşme esnasında erkeğin dişiye bağlanmasında kullanılır ve 4 parmağa sahiptir. Kısa ön ayaklar ile arka uzun bacaklar, kara kurbağalarının aksine lateral bir açılım gösterirler. Bu yassı anatomik

yapı ve görünüm hayvanın yüzmesini kolaylaştırır. *Xenopus*'un tamamen suda yaşadığı göz önünde bulundurulduğunda bu özellikler onun için avantaj sağlar (Green, 2010; Allaerts vd, 1997).

Küflü bir kokuya sahip yumuşak ve sümüksü derisi, başka canlılar için toksik etkiye neden olmaz. Derisindeki mukus tabakası, patojenlere ve aşınmalara karşı koruyucu bir bariyer görevi görür. Gövdesi gibi yassı küçük bir kafatasına sahip olan *Xenopus*, karada yaşayan diğer kurbağalara göre, daha küçük ve daha az belirgin gözlere ve körelmiş yuvarlak bir buruna sahiptir.

Diğer amfibilerin aksine, akciğer / vücut büyüklüğü oranı çok daha büyüktür. İribaşlar (tadpol), yumurtadan çıkmasına paralel olarak çok erken evrelerde gelişim gösteren akciğerler, su derinliğinin ayarlanmasında larvalara yardımcı olmaktadır. Diğer amfibilere göre, hem iribaş hem de ergin dönemde akciğerlere bağımlılık göstermeleri, deri ve solungaçların etkili solunum organı olmadıklarını düşündürmektedir. Dıştan görünür bir kulak zarına sahip olmayan *Xenopus*, lateral çizgi organları sayesinde su içerisindeki hareketlilik algılanır. Metamorfoz sırasında kaybolan lateral çizgi organları, erişkin yaşamı boyunca varlığını devam ettirir. Hem dorsal hem de ventral bileşenlere sahip olan bu yapı dışarıdan bakıldığında kolaylıkla ayırt edilmektedir. (Birhanlı, 2003; Özgünen, 1991).

Günümüze kadar *Xenopodinae* alt ailesine ait 20'den fazla alt türü tanımlanmıştır. Yeni *Xenopus* türleri, bir genom duplikasyon tipi olan allopoliploidleşme yoluyla evrimleşmektedir (Çizelge 1.4.).

Çizelge 1.4. *Xenopus laevis*'e ait bazı tür özellikleri (Green, 2010).

Tür	X. laevis
Ploidi	allotetraploidi
Kromozom Sayısı (N)	18 kromozom
Genom Büyüklüğü	3.1 x 10 ⁹ bp
Gelişim Optimal Sıcaklık	16-22 °C
Yetişkin Büyüklüğü	9-14 cm
Yumurta Çapı	1-1.3 mm
Kuluçka Başına Yumurta Sayısı	500-3000
Jenerasyon Zamanı	2-3 yıl

1.4.1.4. *Xenopus laevis*'in Üremesi, Embriyo ve Larva Gelişimi

2 ile 3 yaşında cinsel olgunluğa erişen *Xenopus*'larda, yetişkin dişilerin boyları yaklaşık ~ 9 – 14 cm, ağırlıkları ise 20 ile 150 gr arasındadır ve kloaklarında papillalar bulunur. Cinsel olgunluğa erişen yetişkin erkekler ise dişilere göre % 10-30 daha küçüktürler (Green, 2010; Özgüven, 1991).

Xenopus'un yabani ortamdaki üreme periyodu mevsimsel olmaktadır. Güney Afrika'da üreme periyodunun zirve yaptığı zaman aralığı, ılıman iklimin hakim olduğu baharın ilk aylarıyla sonbaharın ilk ayları arasında görülür. İdeal koşullar sağlandığında, yetişkin *Xenopus* dişileri, tek bir sezonda 2-3 defa yumurta bırakmaktadır. Yumurtaların çapları yaklaşık 1.5 mm civarındadır ve etraflarındaki koruyucu jel ile beraber 3 mm'yi bulmaktadır. Bunlarda fazla miktarda mutasyon görüldüğünden ve larvalar erken evrelerde birbirlerini yediklerinden fazla sayıda yumurta yapmaları zorunlu olmuştur (Green, 2010; Özgüven, 1991).

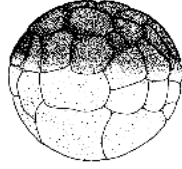
Özellikle laboratuvar ortamına adapte edilen hayvanların gürültü ve kalabalıktan uzak tutulması, laboratuvar koşullarındaki hayvan üretimi için büyük önem arz etmektedir. Laboratuvar koşullarında çiftleşmenin indüklenebilirliği çeşitli dozlarda hormon enjeksiyonu ile sağlanmaktadır. Yumurtlama ve spermatogenezisin *Xenopus laevis*'te indüklenebilmesi için erkek ve dişi bireylerin dorsal lenf bezlerine gonadotropik hormonu enjekte edilir. Yumurta eldesi için kullanılacak erkek ve dişi bireyler, ayrı akvaryumlara 48 saat önce alınarak bekletilir. Bu bekleme süresi sonunda yani yumurta eldesi istenen günden 24 saat önce, sadece erkeğe, bundan sonraki 36. saatin sonunda ise hem erkeğe hem dişiye insan korionik gonadotropin hormonu (hCG) enjekte edilir. Enjeksiyon sonrası erkek ve dişi bireyler aynı akvaryuma alınarak, karanlık ve sessiz bir ortam oluşturulur. Ampleksus 2-6 saat sonra başlar.

Dişiye pelvik bölgesinden sarılarak yumurta dökülünceye kadar ampleksusta kalan erkek, belli aralıklarla sperm bırakır. 10-16 saat kadar yumurta bırakma devam edebilir. Bırakılan sperm yumurtaya animal kutuptan girerek yumurta pronükleusuna ulaşmaya çalışır. Döllenme, yumurta ve sperm pronükleuslarının birleşmesiyle gerçekleşir. Hafif telolesital olan yumurtada vitellüs vejetatif kutupta birikmiştir ve etrafı kendisi tarafından salınmış yumurta membranına bitişik jel membranla örtülüdür (Birhanlı, 2003; Özgüven, 1991).

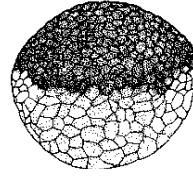
Eş zamanlı olarak bir seri segmentasyon geçiren döllenmiş yumurta, 2, 4, 8 ve daha fazla blastomere ayrılır ve bu evreyi, daha az düzenli bölünmeler takip eder ve morula oluşur. Oluşan morulanın taban bölgesinden içe doğru kavislenmesi sonucu blastula meydana gelir ve bu evreyi gastrulasyon oluşumu takip eder. Gastrulasyon evresinde yüzeyin altına doğru göç eden hücreler mezoderm ve endoderm oluştururken, hücre yüzeyinde kalan yapılar ektodermi oluşturur. Beyin, omurilik ve sinir sisteminin belirginleştiği nörolasyon fazından sonra da bölünmeler devam eder ve 72 saat süren bu evreler tamamlandıktan sonra iribaş yumurtadan çıkar. Bu süre sonunda çıkan fizyolojik gelişimlerini tamamlamış olan iribaşlar, yaklaşık 1 mm'ye kadar büyür ve 4 mm boyunda olurlar. En belirgin özellikleri, griden saydamaya kadar değişen sırt renkleri ve melanin pigmentinin birikmesinden dolayı siyah leke olarak görülen gözleridir. Ağız gelişimi ile birlikte aktif yüzme bu dönemde başlarlar. Bunu takip eden 2-7. günler arası 45-49. evreye tekabül eder. İribaşın 1. formu olarak adlandırılan bu evrede, baş gövdeye göre orantısız olarak büyürken, geçici olarak iki çift solungaç gelişir ve deride pigmentasyonun arttığı görülür. İribaşın 2. formu (49-56. evre), yumurtadan çıkışı takip eden ve aktif olarak beslenmenin başladığı 7. gün ile arka bacak tomurcuklarının görülmeye başladığı yaklaşık 30. gün arasındaki zamana tekabül eder. 56-60 arası ve üstü evreler, yumurtadan 5.-10. hafta arasına tekabül eder ve iribaşın 3. formu olarak kabul edilir. Bu evrenin gözlemlenen en bariz değişikliği, boyun büyümesi sonucu iribaş boy uzunluğunun 30 mm'den 50-80 mm'ye kadar çıkmasıdır. Ön ayağın belirlemeye başladığı bu evrede, arka bacak hızla büyümeye devam eder ve kuyruk kısalmaya başlar. Başkalaşımın gündeğümü olarak adlandırılan bu olay, *Xenopus*'da 59 ile 62. evre arasında gerçekleşir. İleriki evrelerde ise kafanın küçülmesi, kafatası iskeleti, vasküler sistem, farenks ve sindirim sisteminde farklılaşmalar meydana gelir. (Birhanlı, 2003; Özgüven, 1991). Şekil 1.9.'da *Xenopus laevis*'in yumurtasının döllenmesinden itibaren 66. evreye kadar olan bazı önemli aşamalar verilmiştir.



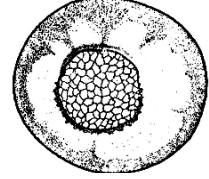
1. Evre (Yumurta)
Ventral Görünüm



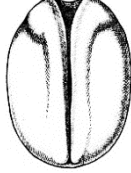
6. Evre (Blastula)
Ventral Görünüm
3 saat 30 dakika



8. Evre (Blastula)
Ventral Görünüm
5 saat



11. Evre
Vejetal Görünüm
11 saat 45 dakika



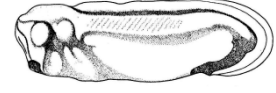
17. Evre
Dorsal Görünüm
18 saat 45 dakika



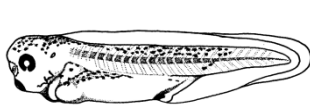
22. Evre
Lateral Görünüm
24 Saat



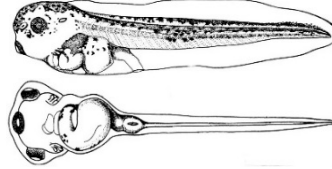
25. Evre
Lateral Görünüm
1 Gün 3 Saat



28. Evre
Lateral Görünüm
1 Gün 8 Saat



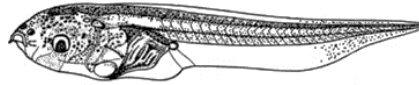
37-38. Evre
Lateral Görünüm
2 Gün 5 Saat 30 dakika



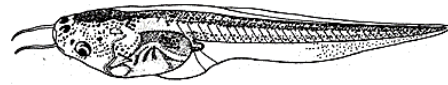
42. Evre
Lateral ve Ventral
Görünüm



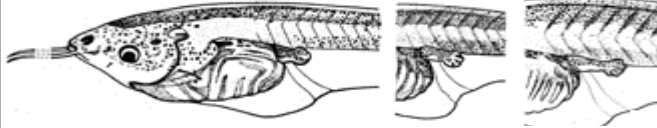
46. Evre
Lateral Görünüm
4 Gün 10 Saat



50. Evre Lateral Görünüm 15 Gün



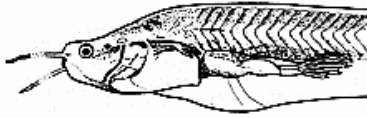
51. Evre Lateral Görünüm 17 Gün



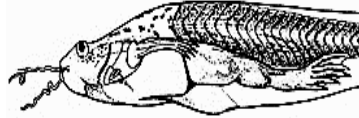
53-54-55. Evre Lateral Görünüm
24 Gün-26 Gün-32 Gün



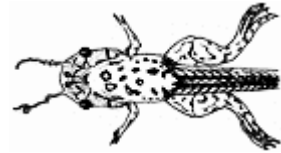
58. Evre Lateral Görünüm
44 Gün



59. Evre Lateral Görünüm 45 Gün



60. Evre
Lateral ve Dorsal Görünüm 46 Gün



62-63-64-65-66. Evre Dorsal Görünüm
49 Gün - 51 Gün - 53 Gün - 54 Gün - 58 Gün

Şekil 1.9. *Xenopus laevis*'in bazı metamorfoz evreleri (Anonim, 2013d).

1.4.1.5. *Xenopus laevis*'in Beslenmesi ve Bakımı

Amfibilerin erken embriyonik dönemlerinde bol miktarda bulunan yolk, yumurtadan çıkan iribaşlarda embriyonik bağırsak ile kalça ektodermi arasında bulunur ve organizmanın günlerce canlı kalabilmesine yardımcı olacak tüm besinleri içerir (Hilken vd, 1995).

Anurular için beslenme ihtiyacı, 25. evreden sonra başlar ve iribaşları için en uygun besin az kaynatılmış ıspanak ve maruldur (Saka, 2003; Delgado vd, 2001). Yeşil sebzelere ve alglere ek olarak, pişirilmiş, kurutulmuş ve ince toz haline getirilmiş sığır ciğeri, *X. laevis* iribaşları için kullanılabilecek besin takviyesidir. Toz halinde yumurta sarısı, kurutulup toz haline getirilmiş unla karıştırılmış bakto-beef ekstresi, kıyılmış çiğ karaciğer, alglar ve protozoanlar kullanılan diğer besinler arasında yer almaktadır (Özgünen, 1994).

Sindirim kanalı, başkalaşım sonrasında değişikliğe uğradığı için gereksinim duyulan besin türü de değişim gösterir. Bira mayası ve balık yağına daldırılmış balık eti, memeli ve tavuk karaciğeri yeni metamorfozdan çıkmış kurbağalar için ideal besinlerdir [54]. Gelişim hızları yüksek olan metamorfoz sonrası hayvanların yetersiz beslenmeleri durumunda, cinsel olgunluğa erişseler dahi vücut büyüklükleri geri kalır. Düzenli olarak besinlerine D vitamini ve kalsiyum takviyesi yapılarak, hem yavru ve hem de erginlerde iskelet anomalisi ve kemik yumuşaması engellenmeye çalışılır (Özgünen, 1994).

Laboratuvar koşullarında, *X. laevis* için ideal su sıcaklığı 20-23°C ve ortam sıcaklığı ise 21-23°C arasında olmalıdır. Ani sıcaklık değişimleri bireylerde yetersiz beslenmeye, metabolizmanın bozulmasına ve immün sisteminin baskılanmasına neden olabilir. Mümkün olduğunca ortam ve su sıcaklığının sabit tutulması ve sıcaklık değişimlerinin $\pm 1^\circ\text{C}$ 'yi aşmaması oldukça önemlidir (Boğa, 1996). 2000 yılından beri laboratuvarımızda yetiştirilen *X. laevis* türü erişkin kurbağalar, haftada iki kez kıyılmış tavuk karaciğeri ile beslenmektedir. Hayvanların beslemeleri için gerekli süre yaklaşık 30-50 dakikadır. Bu süre sonunda akvaryumların suları boşaltılarak temizlenir ve yaklaşık 2-3 gün dinlendirilmiş olan su, hayvanların sırtlarını örtecek şekilde akvaryumlara doldurulur. Laboratuvarımızda ürettiğimiz ve yaşatmayı başardığımız kurbağalar, sürekli olarak 12:12 saat aydınlık:karanlık ışık periyodunda ve $23^\circ\text{C}\pm 1^\circ\text{C}$ sıcaklıkta barındırılmaktadır (Güngördü vd., 2013).

1.5. Biyobelirteçler

WHO'ya göre biyobelirteç, genel anlamda kimyasal, fiziksel ya da biyolojik olabilecek bir potansiyel tehlike ile biyolojik bir sistem arasındaki etkileşimin izlenmesinde kullanılan herhangi bir ölçüm aracıdır (WHO, 1993).

Biyobelirteçler tipik olarak, kirleticilerin ve çevresel stresin biyolojik sistemlerde oluşturdukları etkiler sonucu, hücre, doku, organ veya vücut sıvılarında meydana gelen fizyolojik, hücresel, biyokimyasal ve moleküler değişiklikler gibi biyolojik yanıtların kantitatif ölçümü olarak tanımlanabilir. Biyobelirteçler için en önemli kriterler; hassas, güvenilir, ölçümü kolay, organizmanın sağlığı ve uyum gücü ile iyi bir ilişki kurulabilir olmalarıdır (Peakall, 1994; van der Oost vd., 2003). Biyobelirteçler, WHO (1993) tarafından 3 sınıfa ayrılmaktadır. Bunlar;

- Maruziyet biyobelirteçleri; ekzojen bir maddenin, biyotransformasyon sonucu oluşan metabolitlerinin ya da biyolojik molekülle etkileşimi sonucu oluşan reaksiyon ürünlerinin vücut sıvılarında veya dokularında ölçülmesi esasına dayanır.
- Etki biyobelirteçleri; bir organizmanın doku ya da vücut sıvılarındaki ölçülebilir biyokimyasal, fizyolojik ve diğer değişimleri kapsamaktadır. Etki biyobelirteçleri doğrudan hasarın tanımlanmasında ve olası risklerin değerlendirilmesinde, doz-yanıt ilişkilerinin belirlenmesi için kullanılabilir.
- Duyarlılık biyobelirteçleri; kalıtsal ya da çevresel etkiler sonucu gelişen ve bireyde özel bir ksenobiyotiğe ya da benzer özellikler taşıyan bir ksenobiyotik grubuna karşı hassasiyeti yansıtan göstergelerdir. Genotoksik riskin biyoizlenimi üzerine yapılan çalışmalarda ksenobiyotiklerin metabolizmasına giren enzimlerin çok sayıda genetik polimorfizmi incelenmiştir. Aldehit dehidrogenaz (ALDH2), CYP1A1, CYP1A2, CYP2C, CYP2D6 (p450 sitokromları), EPHX (Epoksihidrolaz), GSTM1, GSTP1, GSTT1 (glutathione S-transferazlar), paraoksonaz (PON) bunlardan bazılarıdır. (van der Oost vd., 2003).

1.6. Çalışmada Kullanılan Biyobelirteç Enzimler

1.6.1. Biyotransformasyon enzimleri

Organizmaların karşılaştıkları ksenobiyotikler, vücut membranlarından geçerek kan dolaşımına girer (emilim) ve çeşitli yollarla elimine edilmeye çalışılırlar. Bir kimyasalın vücuttan elimine edilmesi ya bileşiğin atasal formunda atılması ya da organizma tarafından biyotransforme edilmesi ile olur. Biyotransformasyon enzimleri bütün vücuda dağılmıştır ve pek çok hücre altı kompartmanda bulunur. Organ fonksiyonu, pozisyonu ve kan miktarı nedeniyle karaciğer, yabancı bileşiklerin biyotransformasyon reaksiyonlarını katalizleyen enzimler için en zengin kaynaktır.

Karaciğer ve diğer pek çok organda bulunan ksenobiyotik biyotransformasyon enzimleri büyük oranda düz endoplazmik retikulumda (mikrozomlarda) ya da sitozolde lokalize olmuşlardır. Daha az oranda da mitokondri, çekirdek ve lizozomlarda bulunurlar. Sitozolik enzimler alkol, aminler, ksantinleri okside eden enzimlerdir. Biyotransformasyon olayları %90 mikrozomal enzimlerle, %10 sitozolik enzimlerle olur. Biyotransformasyon olayının temelinde, genellikle orijinal bileşiğe göre daha hidrofilik ve vücuttan daha kolay uzaklaştırılabilen metabolit oluşumu vardır. Bir bileşiğin toksisitesi, biyotransformasyon yoluyla organizma için daha zararlı ya da yararlı hale dönüştürülebilir. Detoksifikasyon reaksiyonları sayesinde, bileşiğin toksisitesi azaltılırken vücuttan atılma oranı artar. Ancak, biyoaktivasyon sonucu oluşan ürün, atasal bileşikten daha toksik, reaktif bir metabolit olabilir (Klaassen, 2001).

Biyotransformasyon enzimlerinin aktiviteleri ve düzeylerindeki değişikliklerin belirlenmesinde en etkili araç “etki biyobelirteçleri”dir. Enzim etkinliğinde, sentezinde veya her ikisinde meydana gelen artış enzim indüksiyonu olarak adlandırılır. İnhibisyon ise indüksiyonun tersidir. Enzim indüksiyonu iki basamakta gerçekleşir: ilk basamak, enzimlerin aktivasyonu iken, ikinci basamak en önemli enzim indüksiyon süreci olduğu kabul edilen “*de novo*“ protein sentezidir. Enzim ve inhibitör maddenin birbirine geriye dönüşümsüz bir şekilde bağlanması veya kompleks oluşturması enzimatik aktiviteyi çoğunlukla bloke eder (van der Oost vd., 2003).

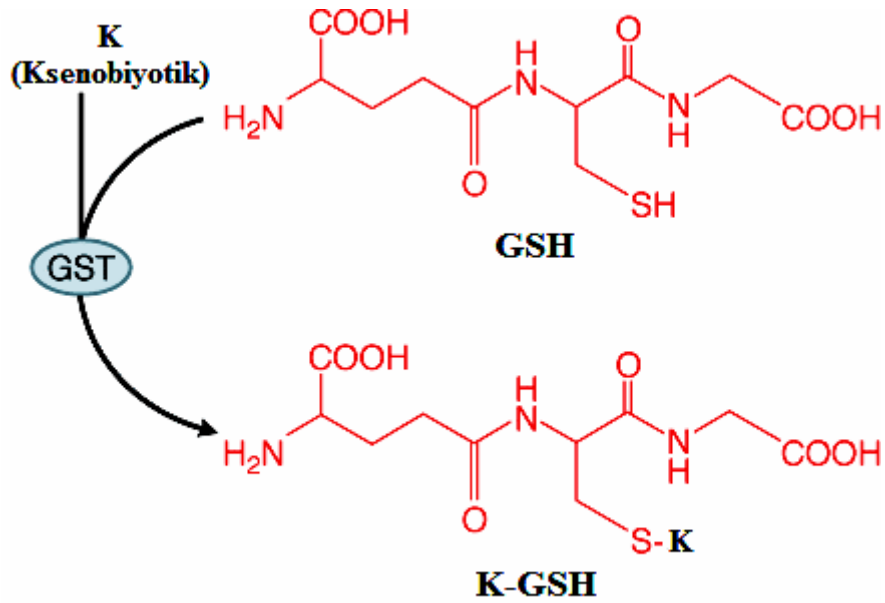
1.6.1.1. Glutasyon S-transferaz

Faz II olarak bilinen konjugasyon reaksiyonları, ksenobiyotik metabolizmasının ikinci basamağını oluşturmaktadır. Faz II reaksiyonlarında görev alan enzimlerin çoğu, polar kimyasal yan gruplar başta olmak üzere, karbonhidrat veya aminoasit gibi bileşiklerin yabancı bileşiğe kovalent olarak ilave edilmesini katalizler. Faz II enzimlerinin katalizlediği polar grupların konjugasyonu sonucu kimyasalların vücuttan atılması kolaylaşır (Hayes vd., 2005; van der Oost vd., 2003).

Faz II reaksiyonlarında anahtar rol oynayan en önemli biyotransformasyon enzimi glutasyon S-transferaz (GST, EC 2.5.1.18) dır. GST elektrofilik karbon, nitrojen ya da sülfür atomlarına sahip, polar olmayan hidrofobik bileşiklerin tripeptid redükte glutasyon [GSH; N-(N-Lglutamil-L-sisteinil) glisin] ile konjugasyonunu katalizlemektedir. Bu enzim, glutasyonun –SH grupları ile endojen ya da ksenobiyotik bileşiklerin reaksiyonunu katalizleyerek onların elektrofilik alanlarını nötralize eder ve daha hidrofilik bileşikleri oluştururlar. GST bu yolla ilaçların, pestisitlerin ve diğer ksenobiyotiklerin metabolize edilmesini sağlayarak hücre canlılığına katkıda bulunur (Şekil 1.10.) (Monterio, vd., 2007; Schmidt, vd., 2005; Townsend ve Tew 2003).

GST bitkilerde, böceklerde, mayalarda, bakterilerde ve özellikle karaciğer olmak üzere çoğu memeli dokularında bulunan dimerik protein yapısına sahip, multifonksiyonel bir multigen ailesidir. Bu enzim ailesi çok sayıda, farklı bileşiğin konjugasyonunu sağlamaktadır. Bunun nedeni spesifik olmayan bir substrat bağlama bölgesinin varlığı ve çok sayıda izoziminin bulunmasıdır. Böylece GST karsinojenik bileşikler, çevresel kirleticiler, ilaçlar ve diğer birçok bileşiği substrat olarak kullanmaktadır. Bir enzim molekülünü oluşturan her iki alt birimin aktif merkezlerinde iki farklı işlevsel bölge vardır. GSH'ı bağlayan hidrofilik G-bölgesi ve elektrofilik substatların bağlandığı hidrofobik H-bölgesi. G-bölgesi yüksek GSH spesifitesi ile tüm GST'lerde oldukça benzerdir. H-bölgesi ise GST'ler arasında tamamen farklı ve substrat bağlama kapasitesi ve çeşitliliği son derece değişkendir. Enzimin yüksek substrat çeşitliliğinin nedeni H-bölgesidir. GST, aslında hücrede sitozolik bir enzim olmasına rağmen, membrana bağlı ve mitokondriyal izoformlarının da bulunduğu bilinmektedir (Klaassen, 2001; Fan vd., 2007; Bekmezci, 2010).

Çevresel ksenobiyotiklere organizmaların farklı duyarlılık göstermesinin nedeni, aynı GST izozimlerine sahip olmamalarıdır. Örnek olarak, alabalık ve farklı Avustralya balık türleri, farklı yedi pestiside maruz bırakılmış ve GST aktivitesinde, ya yanıtın oluşmadığı ya da az bir indüksiyon ile baskılanma görülmüştür (Jahan-Tigh, 2002). İzofom konsantrasyonları dokular arasında da değişiklik göstermektedir. GST aktivitesinin belirlenmesine sıklıkla karaciğer kullanılır. GST'nin solungaç, böbrek ve bağırsakta da biyobelirteç olarak tercih edilmesinin nedeni bu organlarda yüksek konsantrasyonda bulunmasıdır. Örnek olarak, ksenobiyotik maruziyeti sonrasında balıklarda hepatik GST aktivitesinin böbrek ve solungaç gibi organlardan daha fazla indüklendiği görülmüştür (Ahmad vd., 2000). Güngördü (2013) tarafından *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis* ve *Xenopus laevis* iribaşları ile yapılan çalışmada, kontrol grubuna göre methidathion'un sırasıyla, % 173, % 83 ve % 38 düzeyinde; glyphosate'ın ise sırasıyla % 111, % 13 ve % 15 oranında GST aktivitesinde bir artışa neden olmuştur.



Şekil 1.10. Kenobiyotik-GSH konjugasyonu (Brunton vd., 2011).

1.6.2. Antioksidan Savunma Sistemleri

Normal fizyolojik koşullarda hücreler, oluşan serbest radikal ürünleri ve peroksitler gibi moleküllerin neden olabileceği oksidatif hasara karşı antioksidan savunma sistemleri tarafından korunur. Antioksidan savunma sistemi, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidan moleküllerden oluşmaktadır. Enzimatik antioksidanlar, süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT), glutatyon peroksidaz (GPx), glutatyon-s-transferazlar (GST), glutatyon redüktaz (GR)'dan oluşurken, enzimatik olmayan antioksidanlar ise glutatyon (GSH), vitaminler (A, C, E) ve melatoninden oluşmaktadır (De Zwart vd., 1999; Deaton ve Marlin, 2003; Valavanidis, 2005).

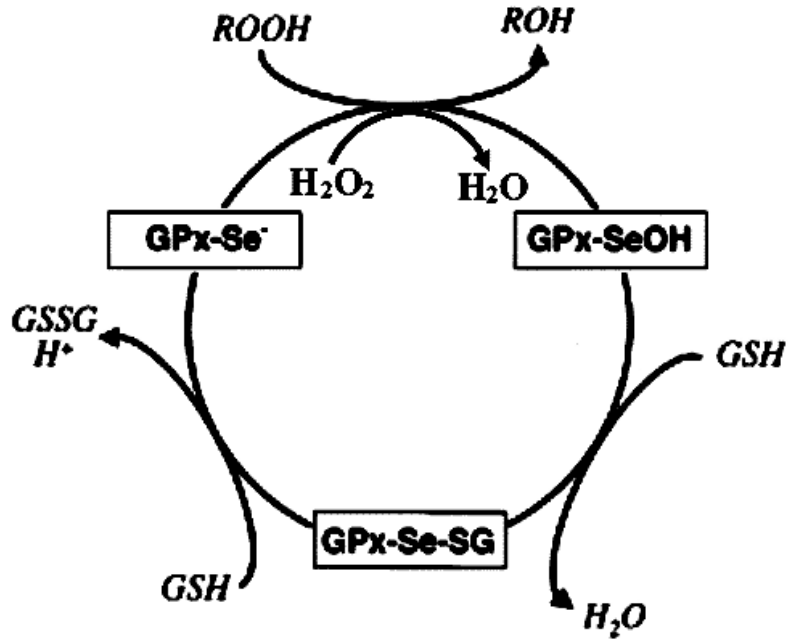
1.6.3. Antioksidan Enzimler

1.6.3.1. Glutatyon Peroksidaz

Glutatyon peroksidaz, (GPx, EC 1.11.1.9) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve organik hidroperoksitlerin (Lipit ve DNA hidroperoksitler gibi) GSH varlığında indirgenmesinden sorumlu bir enzimdir. Mitokondri, sitozol ve hücre membranlarında bulunur (Deaton ve Marlin., 2003). Molekül ağırlığı 76-105 kDa olan GPx, tetramerik bir selenoproteindir. Aktif merkezinde normal bir sisteinin yerine bir selenosistein amino asiti içerir. Bu aminoasitte kükürtün yerini alan selenyum (Se) nükleofilik özellikleri artırır ve çok daha kolay proton verilmesini sağlar. Omurgalı türlerinde enzimin katalitik aktivitesinde bir hidrojen donörü olarak GSH'a gereksinim vardır. Bu enzim, hücre membranlarını, lipid peroksidasyonundan kaynaklanan hasarlardan korur (Ahmad, 1995; Sies, 1997).

Glutatyon peroksidaz enziminin selenyum bağımlı ve selenyum bağımsız olmak üzere iki izoformu vardır. Se-bağımlı GPx enzimi, H_2O_2 ve lipid peroksitlerine (ROOH) karşı aktiftir. Se eksikliği GPx aktivitesinde azalmaya, dolayısıyla lipid peroksidasyonunda artışlara yol açmaktadır. H_2O_2 'e karşı ihmal edilebilir bir aktivite gösteren Se-bağımsız GPx ise sadece lipid peroksitlerinin temizlenmesinden sorumludur. Bu grup enzimler GST olarak adlandırılır (Terada, 2005; Bao ve Williamson, 1996).

GPx, H_2O_2 'yi iki H_2O molekülüne ve membran peroksitlerini (ROOH/LOOH) bir molekül H_2O ve zararsız bir bileşik olan alkole (ROH/LOH) indirger. H_2O_2 tepkimelerinin katalizi birkaç basamakta yürür (Şekil 1.11.). Önce enzimin katalitik merkezi H_2O_2 'yi indirger ve enzim okside edilir. İkinci basamakta, okside enzim bir molekül GSH ile bir kompleks oluşturur. Üçüncü basamakta; kompleks başka bir GSH molekülünü kullanır ve indirgenerek başlangıç durumuna dönerken, iki molekül GSH, GSSG'ye okside olur (Kühn ve Borchert, 2002).



Şekil 1.11. GPx'in katalitik döngüsü (Kühn ve Borchert, 2002).

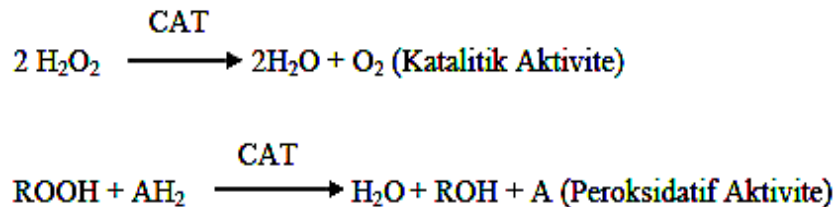
GPx, çevresel kirliliğin canlılarda neden olduğu oksidatif hasarın belirlenmesinde biyokimyasal bir parametre olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Bir herbisit olan 2,4-D ile bir insektisit olan azinfosmetile maruz bırakılmış *Oreochromis niloticus* balık türünün karaciğer GPx aktivitesinde birebir uygulamalarında artış, karışım uygulamalarında ise inhibisyon görülmüştür (Oruç ve Üner, 2000). Bir tatlısu balığı olan *Channa punctatus*'un poliklorlu hidrokarbon olan endosülfana 24 saatlik maruziyeti sonucu indüklendiği ($p < 0.05-0.001$) belirlenmiştir (Pandey vd., 2001).

1.6.3.2. Katalaz

Katalaz (CAT, EC 1.11.1.6), yapısında dört tane hem grubu bulunan bir hemoproteindir. Memelilerde ortalama molekül ağırlığı 250-270 kDa'dur. Bu enzim, esas olarak peroksizomlarda daha az olarak da sitozolde ve mikrozomal fraksiyonlarda bulunmaktadır. Süperoksit radikallerinin dismutasyonu O_2^- den daha yüksek oksidasyon yeteneğine sahip olan H_2O_2 üretimine neden olur. CAT, oluşan H_2O_2 'i suya ve oksijene parçalayarak lipid peroksidasyonuna karşı koruyucu rol oynamaktadır. CAT, hidrojen peroksit (H_2O_2) varlığında bir takım küçük substrat moleküllerine karşı peroksidatif aktivite göstermektedir (Paller ve Patent. 1991).

Katalaz, üç enzim ailesine ayrılmaktadır: monofonksiyonel hem katalazlar, katalaz-peroksidazlar ve Mn içeren katalazlar (Chelikani vd., 2004).

Hidroperoksitlerin karakteristiği olarak CAT çift aktivite sergiler; birincisi iki H_2O_2 molekülünün dismutate edildiği "katalitik aktivite"dir. Burada molekülün biri ardışık iki basamakta bir redüktant iken (hidrojen donörü), diğeri bir oksidant olarak davranır. Diğer tepkime "peroksidatif" olarak adlandırılır (Şekil 1.12.); burada redüktant (AH_2) hidrojen donörüdür. (Marvelli ve Rotilio, 1984). Metanol, etanol, formik asit, fenoller ve aminler DH_2 'ye örnektir. Her iki tepkimede de kompleks I olarak adlandırılan bir aktif enzim- H_2O_2 ara bileşiği oluşturulur. CAT'ın tipik katalitik aktivitesinde kompleks I ve H_2O_2 'nin diğeri molekülü arasındaki tepkime oldukça hızlı bir şekilde ilerlerken, peroksidatif tepkime daha yavaştır. Katalaz, birçok ökaryotik hücrede sitosol ve mitokondrielerde daha düşük düzeydedir. H_2O_2 üretici oksidazların biyogenezleri, ekstrasitoplazmik olarak sentezlenmiş öncülerde olmasına karşın esas olarak peroksizomlarda lokalize oldukları için katalaz peroksizomlarda daha fazladır (Ahmad, 1995; Kelly vd., 1998).

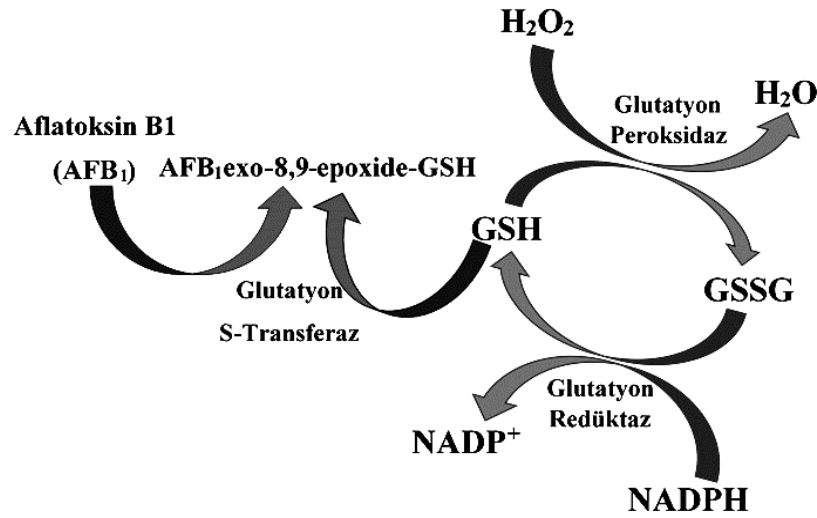


Şekil 1.12. CAT enziminin katalitik ve peroksidatif aktiviteleri (Marvelli ve Rotilio, 1984).

CAT, oksidatif stresin toksik etkilerinin araştırılmasında ve çevresel kirliliğin değerlendirilmesinde uygun bir biyokimyasal belirteçtir. Denizel kirliliğinin izlenmesine yönelik olarak, endüstriyel, kanalizasyon ve gemi trafiğinden kaynaklı atık suların boşaldığı limanlarda yaşayan *Myoxocephalus scorpius* türü balıkların karaciğerinde oksidatif stresin toksik etkileri araştırılmış ve CAT aktivitesinin temiz limanlardaki kontrol gruplarına göre ($p < 0.05$) yüksek olduğu rapor edilmiştir (Stephensen vd., 2002).

1.6.3.3. Glutasyon Redüktaz

Glutasyon redüktaz (GR), glutasyon peroksidazın (GPx) hidroperoksitleri indirgenmesi sonucu oluşan okside disülfit glutasyonun (GSSG), NADPH koenzimi varlığında redükte glutatyona (GSH) dönüşümünü katalize eder (Şekil 1.13.) (van der Oost vd., 2003). GR, antioksidan savunma sisteminde direkt olarak görev alan SOD ve CAT enzimlerinin aksine dolaylı olarak antioksidan etki gösterir (Machala vd., 1998; .Peixoto vd.. 2006).



Şekil 1.13. GR'ın GSH metabolizmasındaki yeri.

Oksijenli solunum yapan hücrelerin mitokondriyal membranlarında gerçekleşen oksidatif metabolizmanın (elektron taşıma sistemini oluşturan alt birimler arasında elektron akışı gerçekleşirken meydana gelen kaçaklar) sonucu reaktif oksijen türleri (ROS) oluşur. Potansiyel hedefleri hücre yapısı ve metabolik yollar olan ROS bileşikleri, oksidatif strese yol açarak hücreye zarar verebilir. Kolaylıkla, peroksidasyona uğrayabilen hücre membranındaki doymamış yağ asitleri, ROS bileşikleri için en duyarlı substratlardır. Bu durum, hücre

metabolizmasının giderek kötüleşmesine ve sonuç olarak hücre ölümüne neden olur. Bunu sinir sisteminde zayıflama ve kas degradasyonu takip eder (Zhang vd., 2004). Hücrelerdeki fizyolojik GSH-GSSG oranı çok önemlidir ve oksidatif stres koşullarında, GSH/GSSG homeostasisinin sağlanmasında GR dikkate değer bir rol oynar (van der Oost vd., 2003). GSH, ya glutatyon peroksidaz (GPx) katalizlediği peroksit redüksiyonunda elektron alıcısı olarak ya da hidroksil, nitrik oksit veya süperoksit gibi serbest radikallerle reaksiyona girerek, ROS bileşiklerinin detoksifikasyonunda görev alır. Sonuç olarak, artan GSSG düzeyi ve azalan GSH miktarı, GSH/GSSG oranında azalışa neden olur. Bu durum oksidatif stres belirtici olarak kabul edilir (Camera ve Picardo, 2002). GSSG yokluğuna bağlı olarak hücre içi NADPH seviyesi düşer ve GR aktivitesi inaktif olur. Ancak, hücre içi GSSG düzeyinde artışına neden olacak oksidatif bir stres sonucu GR yeniden aktive olur. Hücre bileşenlerinin ROS bileşiklerine maruz kalmaları sonucu oluşan oksidatif hasar, artan antioksidan enzim aktivitesi (GPx, GST, GR ve CAT gibi) ile engellenir. Peroksidatif bileşiklerin yüksek oranda bulunduğu kirli sulcul alanlarda yaşayan balıklarda yüksek GR aktivitesi belirlenmiştir (Pandey vd., 2003; Stephensen vd., 2002).

Ferrari vd. (2011) tarafından yapılan laboratuvar çalışmasında, organofosfat türü bir pestisit olan Azinphos methyl ve karbamat türü bir pestisit olan Carbaryl'in *Rhinella (Bufo) arenarum* iribaşlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GR aktivitesini sırasıyla % 23 ve % 32 düzeyinde indüklemiştir. Poliklorlu bifenile (PCB)'e maruz bırakılmış alabalıklarda GR aktivitesinin kontrol grubuna göre >%500 düzeyinde artış gösterdiği saptanmıştır (van der Oost vd., 2003).

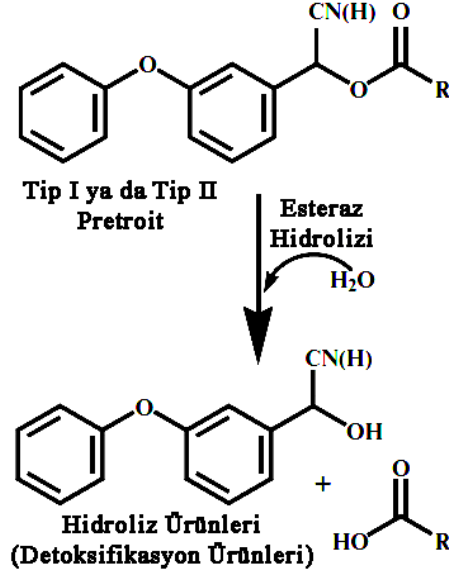
1.6.4. Esterazlar

Esterazlar, Aldridge tarafından A, B ve C esterazlar olmak üzere 3 sınıfa ayrılmıştır (Thompson, 1999). Paraoxon ve diğer nötral organofosforlu (OP) triesterlerin hidrolizinden sorumlu olan A sınıfı esterazlar, genel olarak memelilerde bulunup, kuş serumlarında bulunmayan esterazlardır. Adlandırılmaları, hidrolizledikleri substratın adına (paraoksonaz) ya da kimyasal yapısına (fosfotriesteraz) göre yapılır. Asetilkolinesteraz (AChE), karboksilesteraz (CaE), butirikolinesteraz (BChE), nörotoksikesterazlar gibi Serin hidrolazların büyük bir grubunu içeren B sınıfı esterazlar ise OP bileşikler tarafından inhibe edilirler. OP bileşikleri ile etkileşmeyen esteraz sınıfı ise C esterazlardır (Thompson, 1999).

1.6.4.1. Karboksilesteraz

Karboksilesterazlar (CaE, EC 3.1.1.1), ester substratlarından alkol bağının hidrolizini katalizleyen serin hidrolazların bir sınıfıdır. B esteraz grubuna dahildir. Pekçok omurgalı ve omurgasız türde yüksek aktiviteye ve izole edilmiş birçok izoenzime sahip olan CaE'ler, esterleri, tiyoesterleri ya da karboksilik asitlerin amid gruplarını içeren geniş bir substrat özgüllüğüne sahiptir. CaE'ler, ekolojik risk değerlendirme çalışmalarında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. (Barron vd., 1999; Cashman vd., 1996). Esteraz-D (insanda) ve aliesterazlar olarak da adlandırılan, lipit ve steroid metabolizmasında önemli bir role sahip olan CaE'ler, pestisitler dahil pek çok esterli bileşiğin biyotransforme edilmesinden sorumludurlar. Detoksifiye ettikleri ksenobiyotik ve endojen bileşiklere örnek olarak, karbofuran, pretroit, OP, propanidler gibi pestisitler, akrilatlar, T2 gibi mikrotoksinler ve nikotinik asidin esterleri verilebilir (Jokanovic, 2001; Thompson, 1999; Pretti ve Cognetti, 2001).

CaE'ler, multi gen ailesi ürünleri olup, çoğu memeli dokusunun mikrozomal fraksiyonlarında bulunur. α/β katlanması gösteren 47 ve 65 kDa arasında moleküler ağırlığa sahip proteinlerdir (Jokanoviç, 2001; Hosokawa, 2008). Birçok dokunun endoplazmik retikulumuna lokalize olan CaE, genellikle karaciğerde yüksek düzeyde bulunur (Huang, 1997). CaE karaciğerde sentezlenerek, çözünür formda bulunduğu plazmaya salgılanır. Ayrıca CaE, farklı düzeylerde akciğer, merkezi sinir sistemi, testis, yağ doku, kalp, kas ve lökositlerde de bulunabilir. Serin esterazların aktif bölgeleri, aktif serin motifli (GX SXG) bir üçlü katalitik merkeze sahiptir. CaE'nin aktif bölgesi izolösin-fenilalanin-*glisin*-histidin-*serin*-methionin-*glisin*'den oluşan bir peptid içermektedir. CaE, asil-enzim ara ürününün hem oluşumunu hem de yıkımını içeren iki basamaklı bir reaksiyonla karboksilik asidin esterlerini hidrolizler. İlk aşamada karboksilik ester, aktif bölgedeki katalitik veya nükleofilik serinin hidroksil grubunu asilleyerek asil-enzim ara ürününü oluştururken, ikinci aşamada serin, suyun varlığında deasillenerek alkol ve karboksilik asit oluşumuna neden olur ve kendisi tekrar proteindeki orijinal lokasyonuna geri döner. Bu şekilde, ksenobiyotikler ana bileşikten daha az toksik hale getirilmektedir (Şekil 1.14.) (Wheelock vd., 2008; Jokanoviç, 2001).

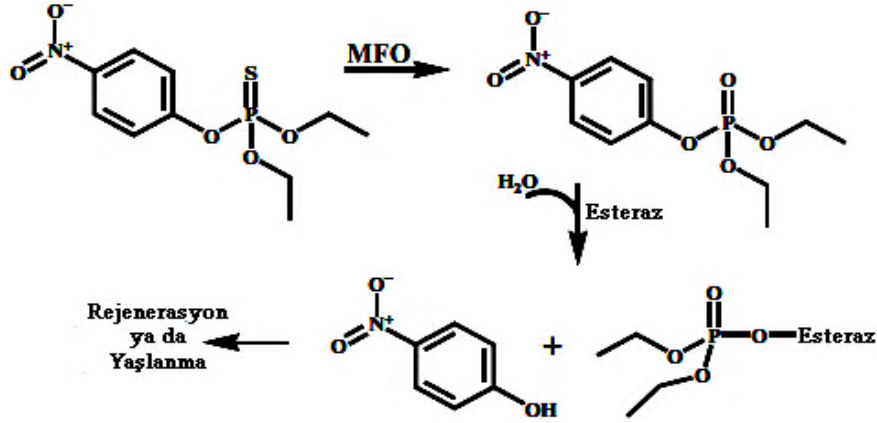


Şekil 1.14. Pretilinlerin esteraz aracılı hidroлиз (Wheelock vd., 2008).

Yapılan çalışmalar sucul ekosistem için oldukça toksik olan pestisitlerin balıklardaki yüksek CaE aktivitesi sayesinde önemli ölçüde biyolojik birikim oranının azaltıldığını göstermektedir (Barron vd., 1995). Son dönem çalışmaları pestisitlere karşı CaE'nin bu koruyucu etkisinin memeliler için de geçerli olduğunu göstermektedir. Memelilerin serum ve karaciğer dokularında CaE konsantrasyonu yüksektir (Abbas ve Hayton, 1997).

Bir organizmanın pretroid, OP ve karbamat bileşiklere karşı duyarlılığı, o canlının endojen CaE aktivitesinden etkilenebilmektedir. Bu nedenle CaE aktivitesinin ölçülmesi tarımsal kimyasalların ekosistem üzerindeki etkilerinin önceden belirlenmesi için kullanışlı bir araç sağlamaktadır (Wheelock vd., 2005). *Xenopus* iribaşlarının pretroid insektisilerden Lambda Cyhalothrine 24 saat boyunca maruz kaldığı laboratuvar çalışmasında, CaE aktivitesinin %27.4 ($p < 0.001$) düzeyinde inhibisyona uğradığı rapor edilmiştir (Aydın-Sinan vd., 2012). Robles-Mendoza tarafından yapılan laboratuvar çalışmasında ise klorpirifos'a maruz bırakılan *Ambystoma mexicanum* türü semenderde CaE aktivitesinin yaklaşık %50 ($p < 0.05$) düzeyinde inhibisyona uğradığı bildirilmiştir (Robles-Mendoza vd., 2011). Ester bağları içeren OP bileşiklerinin detoksifikasyonu, CaE'nin katalizlediği üç farklı yolla gerçekleşir. Birinci yol, OP'deki ester bağlarının CaE tarafından hidroлизidir. İkinci yol, serbest OP'nin sirkülasyondaki konsantrasyonunu azaltmaya yönelik olarak, CaE ve diğer proteinlere bağlanmasıdır. Böylece hayati dokularda

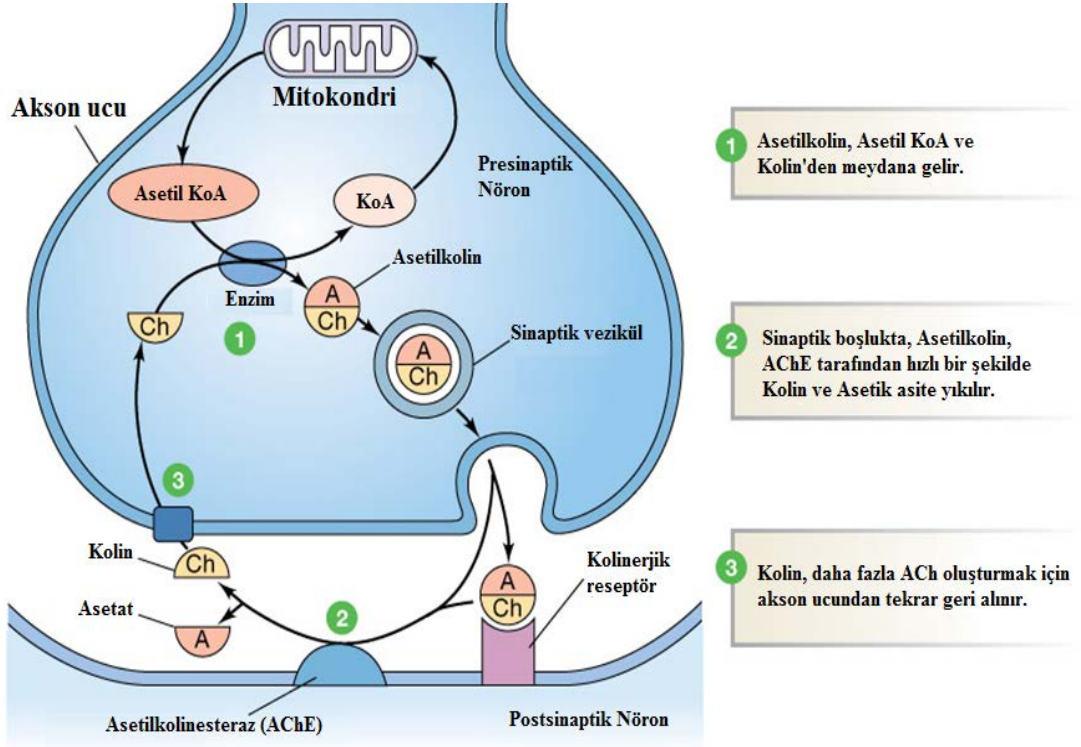
AChE ile reaksiyona girebilme ihtimali azalır. Üçüncü yol ise CaE'lerin aktif bölgesindeki serinin hidroksil grubuna bütün OPlerin bağlanarak enzimleri fosforilleyebilmesidir. Bu fosforil grubu sudan bir hidroksil grubu alarak kendiliğinden enzimden ayrılmakta ve oluşan organofosforik asit ana bileşiğe göre daha az toksik hale gelmektedir (Şekil 1.15. Wheelock vd., 2008) (Jokanoviç, 2001; Küster, 2005).



Şekil 1.15. CaE'nin paratyon (OP pestisit) tarafından inhibisyon reaksiyonu. Paratyon ilk olarak MFO sistemi tarafından aktif "okson" bileşiğine metabolize edilmektedir. Paraokson hidroliz sürecinde esteraza bağlanmakta, su girişi ile p-nitrofenol açığa çıkmaktadır. Esteraz enzimi ise kalıcı olarak fosforillendiğinden aktivitesini kaybetmektedir (Wheelock vd., 2008).

1.6.4.2. Asetilkolinesteraz

Asetilkolinesteraz (AChE, gerçek kolinesteraz, EC 3.1.1.7), eritrosit membranlarında, iskelet kaslarında ve çoğunlukla sinir dokuda, özellikle beyinde lokalize olmuştur. AChE, nörotransmitter bir madde olarak görev yapan asetilkolinin (ACh), kolin ve asetik asite hidrolizinden sorumlu özgül bir esteraz enzimidir (Şekil 1.16.). Ayrıca biyolojik aktivitenin sonlandırılmasından ve yıkımından sorumlu olan AChE molekülü, her biri 80 kDa moleküler ağırlıkta ve aktif bölgeleri farklı dört alt birimden meydana gelen bir proteindir. ACh, omurgalılarda birincil nörotransmitter olarak, otonomik sinir sisteminde ve beyinde, özellikle nöromusküler sinapslarda bulunur. ACh, nöral transmisyon sırasında nikotinik ya da muskarinik gibi bir ya da iki reseptöre bağlanır. ACh'nin nöromusküler sinapslarda bulunan nikotinik reseptöre bağlanması, kaslarda uyarılma ve kasılma ile sonuçlanır. ACh'nin bağlantısını postsinaptik membrana bağlanan AChE keser ve böylece kolinerjik nöral transmisyon sona erer (Şekil 1.16.) (Beauvais vd., 2000; Igarashi vd., 2003).



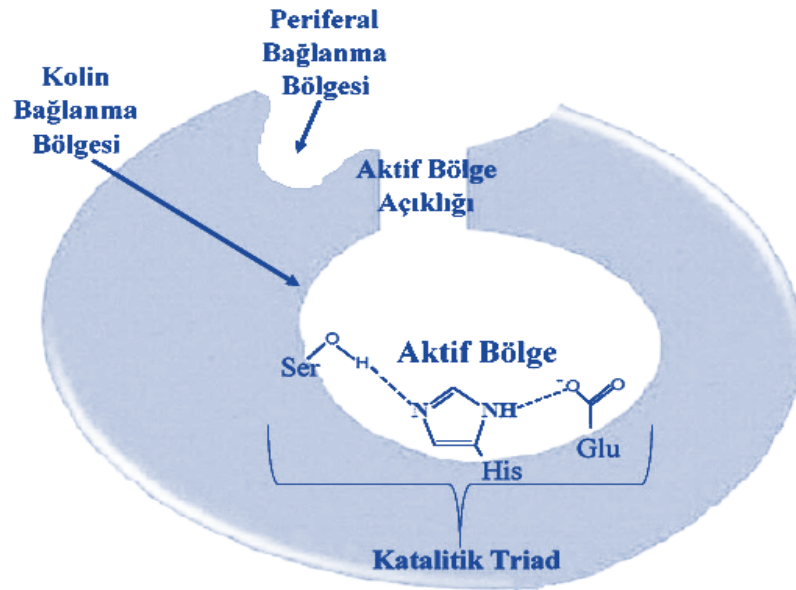
Şekil 1.16. İmpuls iletimi ve AChE'nin implus iletimini sonlandırma mekanizması (Güngördü, 2007).

Asetilkolinin hidrolizi sonucu sinir veya kasların paralizi ve lokal reseptörlerin devamlı uyarılması engellenir. AChE ile asetilkolin bağlandığında esteratik alt merkez denen aktif merkezin ikinci bölgesinde hidrolitik reaksiyonlar meydana gelir. Burada asetilkolinin ester bağları kırılır, asetat ve kolin açığa çıkar. Kolin daha sonra presinaptik membrandaki yüksek affiniteli kolin toplama sistemi tarafından hızla tutulur. Asetat esteratik alt merkezdeki serin rezidüleri ile kovalent bağlanarak AChE'nin geçici asetillenmiş formunu oluşturur. Bu geçici bileşik bir molekül su ile reaksiyona girer ve asetat grubu serbest kalır. Asetilkolinesteraz esterik ve anyonik denen iki etkin kısma sahiptir. Anyonik kısım negatif yüklüdür ve iki karboksilli bir aminoasitin iyonize karboksil grubundan ibarettir. Asetilkolinin katyonik azotu buraya elektrostatik olarak bağlanmıştır. Esterik kısım pozitif yüklü olup iki kısımdan meydana gelir. Bunlardan ilki serinin hidroksil grubudur. İkincisi ise histidin bazik imidazol halkasıdır. Bu kısım serinin hidroksil grubuna hidrojen bağları ile bağlanarak onun etkinliğini artırır (Şekil 1.17.) (Vale, 1998; Ören, 2009).

Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi, sucul ve karasal ekosistemlerde insektisit kirliliğinin ölçümünde yüksek özgüllüğe sahip bir biyobelirteçtir. Asetilkolin mekanizmasını bloke eden kimyasallardan bazıları antiasetilkolin esteraz

şeklinde görev yapar ve enzimi inhibe eder. Karbamat ve organofosfatlar da enzimle kompleks kurarlar. Sık kullanılan organofosfatlı insektisitlerin çoğu fosfor atomuna bağlı olarak ya iki metil ya da iki etil ester grupları taşırlar. Böylece dimetilfosforlanmış ya da dietilfosforlanmış AChE meydana gelir. AChE inhibisyonu, enzimin aktif alanındaki serin ile OP bileşiğin reaksiyonu sonucu ortaya çıkar. Bu inhibisyon çok düşük konsantrasyonlarda ortaya çıkar. Dimetilfosforlanmış AChE'nin kendiliğinden reaktivasyonu oldukça hızlıdır. OP'lere maruz kalma sonrası gerçekleşen inhibisyondan sonra, AChE aktivasyonunun geri-dönüşü büyük oranda enzimin *de novo* sentezine bağlıdır ve bu genellikle balıklarda haftalar almaktadır. Dietilfosforlanmış AChE'de ise bu durum söz konusu değildir (Vale, 1998; Ören, 2009; Wogram vd., 2001; Güngördü, 2007). OP ve karbamat insektisitlere ek olarak, AChE aktivitesinin inhibisyona uğradığı diğer bazı pestisitler, ağır metaller ve deterjanlar gibi çevresel kirleticilere maruz kalan organizmalarda da rapor edilmiştir (Lionetto vd., 2004).

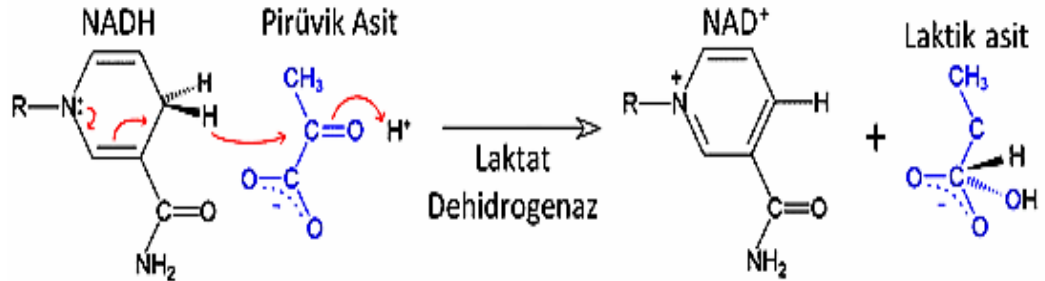
Enzimin inhibisyonu, sinir sisteminde sinapslarda asetilkolin miktarının artışına neden olur. Asetilkolinin aşırı birikimi; merkezi sinir sistemi kolinerjik iletimi, somatik sinirler, otonomik gangliyonlar, parasempatik sinir uçları ve yer yer sempatik sinirleri uyarır. Böylece sinir sinyallerinin (implusun) sürekli transmisyonu, tetani ve sıklıkla solunum bozuklukları ve nihayetinde ölümle sonuçlanabilir (Pretti, 2001).



Şekil 1.17. AChE enziminin yapısal özellikleri (Soreq and Seidman, 2001; Kim vd., 2011).

1.6.5. Laktat Dehidrogenaz

Laktat dehidrogenaz (LDH, EC 1.1.1.28) sitozolik bir enzimdir. Hayvan dokularında aerobik oksidasyon yeterince oksijen ile desteklenmediğinde LDH, NADH'ın varlığında glikoliz basamağının son ürünü olan pirüvik asidi, laktik aside dönüştürür. (Şekil 1.18.). Pirüvik asidin laktik aside redüksiyonu sonucu NAD^+ üretimi gerçekleşir. Glikolizin düzenlenmesinde önemli bir rol oynaması nedeniyle, normal hücresel fonksiyonlar için de çok önemlidir. Bütün dokularda bulunur ama özellikle böbrek, karaciğer ve kas dokuda plazmadakine göre daha yüksek aktivite gösterir (Bernet vd., 2001; Nelson ve Cox, 2001). Bu nedenle plazmadaki LDH aktivitesinde görülen bir artış karaciğer, böbrek ve kas gibi organlarda hücresel hasarın bir göstergesi olarak kabul edilir. Araştırmalara göre enfeksiyon, zehirlenme ya da toksik bir bileşikten dolayı hücre membran hasarlarının ya da doku nekrozlarının oluşması; karaciğer, iskelet ve kalp kasında meydana gelen hasarlar LDH aktivitesi önemli düzeylerde etkilenmektedir. Bu gibi hücresel bir enzimin aktivitesindeki değişimin derecesi öncelikle hücresel hasarın şiddetine ve büyüklüğüne bağlıdır (Singh and Sharma, 1998; Bernet vd., 2001).



Şekil 1.18. Laktat dehidrogenaz tarafından katalizlenen reaksiyon

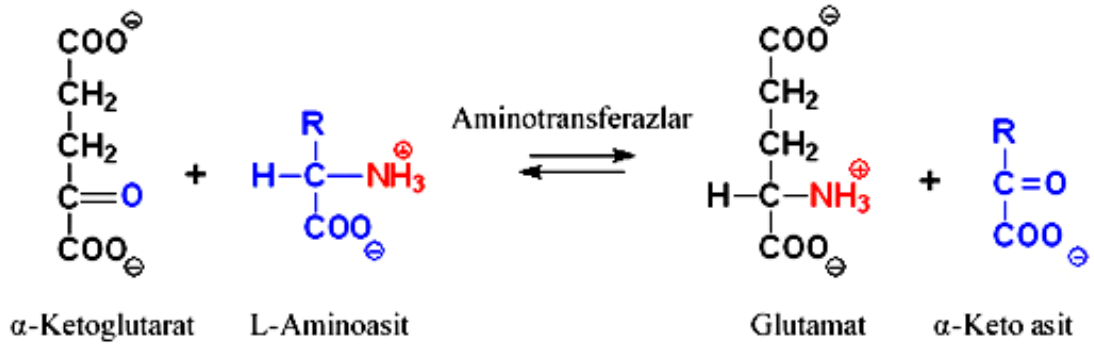
LDH'ın omurgalılarda beş farklı izozimi bulunur ve bütün izozimleri, iki farklı polipeptidin (M ve H) farklı oranlarda olması koşuluyla dört polipeptid zincirinden meydana gelir (Nelson ve Cox, 2004; Azstalos vd., 1990). Enzimin amfibi iribaşlarında türe özgü bir LDH izozim şekli bulunduğu *Rana temporaria* ve *Xenopus laevis* ile yapılan çalışmalarda rapor edilmektedir. Bu izozimlerin iribaşlarda 5 gruba ayrıldığı ve her iki türde de farklılaşmamış dokularda en çok bulunan izozimin LDH-1 olduğu bulunmuştur (Hornby vd, 1989). Oksijenli solunumu etkilediği bilinen, pretroid insektisitler, halojenli benzen ve fenoller, petrol hidrokarbonlar ve organoklorlu (OC) bileşiklerin sucul canlılardaki anaerobik solunum kapasitesinde değişimlere neden olduğu bildirilmiştir. Oksijenli solunum

düzeyinde artış ve azalış şeklinde olan değişimler, canlının LDH aktivitesine göre değerlendirilebilir. Örnek olarak, evsel atık suların ve tarımsal faaliyetlerin neden olduğu kirliliğe maruz kalan bir haliç sistemindeki *Acanthopagrus butcheri* balık türünün karaciğer ve solungaç LDH aktivitelerinde artış görülmüştür. Bu artışın, mitokondriyal membran hasarı sonucu elektron transfer sisteminde meydana gelen inhibisyonun neden olduğu enerji açığının giderilmesine yönelik olduğu ileri sürülmüştür (Webb vd., 2005). *Clarias batrachus* balık türünün karaciğer LDH aktivitesi üzerine, bir organoklorlu bileşik olan endosülfan pestisitinin inhibe edici etkisi, Mishra vd. (1997) tarafından değerlendirilmiştir. Bulgular, endosülfan ya da metabolitlerinin enzim ve enzim-substrat kompleksine verimli olmayan bağlanmalarının ya da enzim sentezinin bloke edilmesinin, verimli enzim-substrat kompleksinin oluşumunu engellediği ve balıklarda LDH aktivitesinin dolayısıyla anaerobik metabolizma verimliliğinin azalmasına neden olduğunu göstermiştir.

1.6.6. Aminotransferazlar

Transaminasyon reaksiyonları aminoasit metabolizmasındaki basamaklar arasında yer alırlar. Bu reaksiyonlar, karaciğer, iskelet kası, beyin gibi hemen her organ ve dokuda gerçekleşir. Proteinlerde bulunan 20 L-aminoasidin α -amino grupları, aminoasitlerin oksidatif yıkımları sırasında uzaklaştırılır. Bu reaksiyonlarda azot, α -amino grubu şeklinde orijinal aminoasitten α -ketoglutaratın α -karbon atomuna transfer edilerek glutamat oluşturulur ve geriye aminoasidin analogu olan uygun α -keto asit kalır (Şekil 1.19.). Lizin ve treonin dışındaki bütün aminoasitler transaminasyon reaksiyonlarına girerler. Bu reaksiyonları katalizleyen enzimlere transaminaz ya da aminotransferaz adı verilir. Reaksiyon geri dönüşümlü olduğu için bu enzimler aminoasitlerin hem yıkımında hem de sentezinde rol alırlar. Yeni aminoasitlerin ya da azotlu ürünlerin sentezinde kullanılmayacak olan reaksiyon sonrası oluşmuş amin grupları, basit boşaltımla atılırlar. Örnek olarak, sucul organizmalar azotu amonyak (NH_4^+) halinde kolayca su ortamına verirler.

Karaciğere özgü enzimler olan alanin aminotrasferaz ve aspartat aminotransferaz, sitotoksisite, hepatotoksisite ve histopatolojik değişimlere çok hassas olan enzimlerdir (Nelson ve Cox, 2004; Aydın-Sinan vd., 2012).



Şekil 1.19. Aminotransferaz tarafından katalizlenen reaksiyon.

1.6.6.1. Alanin Aminotrasferaz

Glutamat pirüvat transaminaz olarak da adlandırılan alanin aminotrasferaz (ALT, EC 2.6.1.2), alanin aminoasidinden amino grubunu α -ketoglutarata transfer ederek piruvat ve glutamik asidin sentezlendiği geri dönüşümlü transaminasyon reaksiyonunu katalizler. ALT, glukoz ve protein metabolizmasında önemli yeri olan bir enzimdir. Bu sayede vücutta toksik olan amonyağın üreye dönüşmesinde rol oynar. ALT enzimi hepatosit içinde sadece sitoplamada mevcuttur. İnsanlarda mitokondride bulunan izozimide mevcuttur. ALT enzimi, karaciğer dışındaki dokularda düşük konsantrasyonda olduğu için yüksek serum ALT seviyelerinin karaciğer hasarı için spesifik olduğu düşünülmektedir (Güneş, 2010; Vaglio ve Landriscian, 1999).

1.6.6.2. Aspartat Aminotrasferaz

AST (AST, EC 2.6.1.1), L-aspartat ve 2-oksaloasetat arasında geri dönüşümlü transaminaz reaksiyonunu katalizleyen bir enzimdir ve glutamat oksaloasetat transaminaz (GOT) olarak da adlandırılırlar (Vaglio and Landriscian, 1999). Enzimin çok sayıda hayvansal çalışmada rapor edilen elektroforetik iki temel formu bulunmaktadır: biri çözüner ya da sitozolik form (c-AST) ve diğeri mitokondrial form (m-AST). Her iki izozim de aminoasit metabolizmasına üre ve sitrik asit döngüsü arasında bir bağlantı olarak katılmaktadır. Sitozolik izozim özellikle daha yoğun olarak glikoneogenesis sürecinde yer almaktadır (Srivastava vd., 1990). AST, karaciğer, kalp ve iskelet kasında, böbrek, pankreas ve eritrositlerde yüksek konsantrasyonlarda bulunmaktadır. Bu dokularda hasar olduğu zaman AST kana salınır ve serum seviyeleri yükselir (Günşar, 2003).

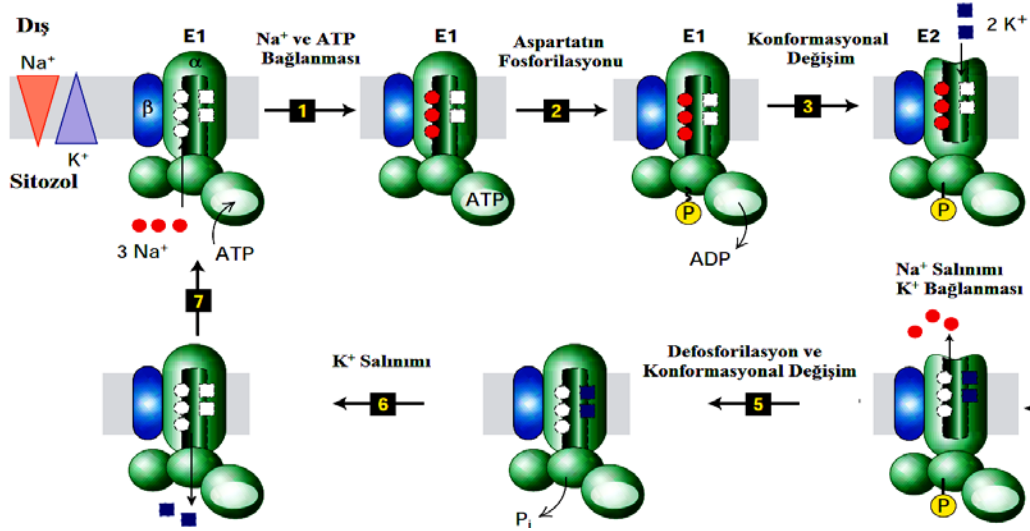
Transaminazlar (AST ve ALT) serumda çok az miktarda bulunan intrasellüler enzim olmakla birlikte, karaciğer hücre hasarları enzimlerin plazmaya sızmasına neden olabilir (Oruç ve Üner, 2000). AST ve ALT gibi belirli enzimlerin inhibisyonu ya da aktivasyonunun neden olduğu protein metabolizmasındaki değişimler, toksik maddelerin karaciğerde neden olduğu olumsuz etkiler arasında rapor edilmektedir (De la Torre vd., 2005). Kan plazması mAST aktivitesinin belirlenmesi karaciğer hücre hasarının şiddeti hakkında bilgiye ulaşmamızı sağlar. Ayrıca çeşitli ksenobiyotiklere maruz kalmış balıklarda, AST ve ALT biyokimyasal bir stres indikatörü olarak kullanılmıştır. Trifluralin herbisitine maruz bırakılan sazan balıklarında karaciğer ve kan serum AST aktivitesinde önemli bir artış olduğu gözlenmiştir. Bir OP pestisit olan kurakrona maruz kalmış *Cyprinus carpio*'da ALT ve AST aktivitelerinin kontrol gruplarına göre çok daha yüksek olduğu rapor edilmiştir. AST ve ALT' nin balık kan plazmasında belirlenmesi, balıkta bakteriyel, viral veya parazitik bir enfeksiyonun tanısında veya zehirlenmelerde kullanılacak parametrelerdendir. Toksikantlar enzim aktivitesini ve sentezini inhibe ederek kanda düşük enzim aktivitesi gözlenmesine neden olurlar (Aydın, 2004). Lambda Sihalotrine ve deltametrin pestisitlerine maruz kalan *Xenopus iribaş*larında AST aktivitesinin inhibisyona uğradığı rapor edilmiştir (Aydın-Sinan vd., 2012).

1.6.7. ATPaz Enzimleri

Adenozin trifosfat (ATPaz) enzimleri hücre içi fonksiyonlarda önemli rol oynayan, membrana bağlı ve toksisiteye duyarlı belirteç olan bir grup enzimdir. Dokulardaki iyon hareketleri, osmotik basınç, membran geçirgenliği ve yüksek enerjili metabolik transformasyonların kontrolünde önemli görevlere sahip olan ATPaz enzimleri yüksek elektronegatif özellik gösterirler. (Riedel ve Christensen, 1979; Watson ve Beamish, 1980; Thaker vd., 1996; Atlı ve Canlı, 2011a). İyi bilinen membrana bağlı ATPaz'lar, Na^+/K^+ -ATPaz, Ca^{+2} -ATPaz ve Mg^{+2} -ATPaz'dır. ATPaz'lar, iyonik ve osmoregülatör sistemlerdeki bozuklukların erken uyarılmasını işaret etmektedir (Stagg vd., 1992; Sancho vd., 2003).

Na^+/K^+ -ATPaz (E.C. 3.6.3.9), hücre içi Na^+ 'yı hücre dışı K^+ ile 3:2 oranında değiştirmek için ATP'nin hidrolizi sonucu açığa çıkan enerjiyi kullanmaktadır (Şekil 1.20., Lodish vd., 2008). Böylece hücre hacminin düzenlenmesi, iyon taşınımı, elektrokimyasal gradientin korunması gibi temel fonksiyonlarda önemli görevlere

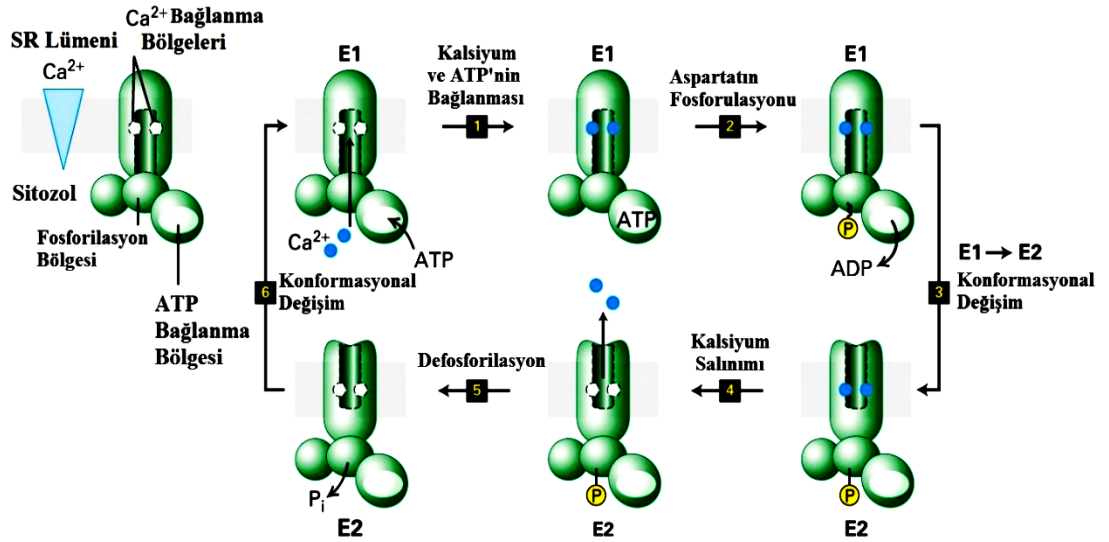
sahiptir (Grosell vd., 2003). Na^+/K^+ -ATPaz enziminin, kemikli balıkların solungaç epitellerinde, çoğunlukla mitokondriye zengin hücrelerde yer aldığı bilinmektedir. Na^+/K^+ -ATPaz enzimi, P tipi ATPaz grubunda olup heterodimerik bir integral membran proteindir. Enzim 100 kDa moleküler ağırlığında α alt ünitesi ile 60 kDa moleküler ağırlığındaki glikozitlenmiş β alt ünitesinden oluşmuş $-\text{SH}$ grubu bakımından zengin ve bir steroid türevi (kardiyak glikozit) ouabain tarafından inhibe olan bir enzimdir. Sucul organizmalar dikkate alındığında, Na^+/K^+ -ATPaz'ın iyon düzenlenmesinde yaşamsal bir öneme sahip olduğu bilinmektedir ve Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesindeki olası değişikliklerin doğal stres kaynaklarında olduğu gibi çeşitli çevresel kirleticilere tepki olarak da geliştiği gözlenmiştir. (Bianchini ve Wood, 2003; Bianchini vd., 2004, 2005).



Şekil 1.20. Plazma zarındaki Na^+/K^+ -ATPaz'ın çalışma modeli.

Mg^{+2} -ATPaz (E.C. 3.6.3.1) enziminin oksidatif fosforilasyon ve iyon taşınmasında önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte Mg^{+2} -ATPaz enzimi, balıklarda solungaç epitelyumundan hücre membran bütünlüğü ve geçirgenliğinin stabilizasyonu için gerekli olan Mg^{+2} 'un taşınmasında görev yapmaktadır (Parvez vd., 2006). Mg^{+2} -ATPaz oligomisine (ATP sentaza bağlanıp, proton kanallarını kapatarak protonların matrikse geri dönmesini engelleyen ve sonuçta ATP sentezini inhibe eden madde) duyarlı olan ve olmayan olarak sınıflandırıldığında; bunlardan oligomisine duyarlı olanın solunum mekanizmasında görev alan mitokondriyal Mg^{+2} -ATPaz, oligomisine duyarlı olmayanın ise daha çok endoplazmik retikulumda bulunan Mg^{+2} -ATPaz olduğu düşünülmektedir (Stagg ve Canlı, 1996).

Sarkoplazmik retikulum tübüllerinde lokalize olan Ca^{+2} -ATPaz (E.C. 3.6.3.8) ise, hücre membranının stabilizasyonu için gerekli olan Ca^{+2} 'un nM düzeylerinde aktive olabilmekte ve ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak sitoplazmadan Ca^{+2} 'un uzaklaştırılmasında ve böylece düşük hücrel Ca^{+2} içeriğinin korunmasında görev almaktadır (Watson ve Beamish, 1980; Saxena vd., 2000) (Şekil 1.21., Lodish vd., 2008). Ca^{+2} -ATPaz, Ca^{+2} metabolizmasındaki önemi ve yapısındaki fonksiyonel -SH gruplarına bağlı olarak ağır metal etkisinde inhibe olması ile kirlilik çalışmalarında büyük önem kazanmaktadır (Wong ve Wong, 2000). Yapılan çeşitli araştırmalar sonucu balıkların Ca^{+2} 'u sudan absorpladıkları görülmüştür ve tatlı su balıklarında genel olarak emilimin bağırsaktan çok epidermal yolla olduğu ve balıkta Ca^{+2} metabolizmasının düzenlenmesinde Ca^{+2} -ATPaz'ın önemli göreve sahip olduğu da belirtilmektedir. Solungaçlar dışında Ca^{+2} -ATPaz aktivitesinin yüksek olduğu diğer bir doku kalptir ve kalp sarkolemmasında buna bağlı olarak büyük oranda Ca^{+2} depolanmaktadır (Bansal vd., 1985). Sarkoplazmik retikulumda Ca^{+2} -ATPaz, kas kasılmasında önemli rol oynayan bir intrinsik zar enzimidir. Enzim, Ca^{+2} iyonlarının sitozolden sarkoplazmik retikuluma taşınmasında görev alarak kasın gevşemesine neden olmaktadır. Bununla birlikte Ca^{+2} -ATPaz aktivitesinin zar lipid ortamından etkilendiği bilinmektedir (Watson ve Beamish, 1980; Saxena vd., 2000; Godiksen ve Jessen, 2002).



Şekil 1.21. İskelet kas hücrelerinin sarkoplazmik retikulum zarında yer alan Ca^{+2} -ATPazının çalışma modeli.

2. KAYNAK ÖZETİ

2.1. Neonikotinoid ve Strobilurin Grubu Pestisitlerle Yapılan Çalışmalar

Neonikotinoid ve strobilurin pestisitlerin sucul canlıların enzimlerinde meydana getirdiği değişimler ile ilgili literatürde çok az sayıda çalışma bulunmaktadır. Diğer neonikotinoid ve strobilurin pestisitlere oranla thiakloprid ve trifloksistrobin etkileriyle ilgili oldukça sınırlı sayıda literatüre rastlanmıştır. Deney hayvanı olarak kullandığımız *X. laevis* üzerine bu pestisitlerin akut toksik etkilerinin daha önce çalışılmamış olması çalışmamızın orjinalitesini göstermektedir.

Neonikotinoid bir insektisit olan imidaklopridin (IMI) subakut etkisine maruz bırakılan toprak solucanı *Aporrectodea nocturna* ve *Allolobophora icterica*'da AChE aktivitesinin değişmediği bildirilmiştir. IMI'nin enzim aktivitesinden çok nAChRlerinin blokajı yoluyla etkili olduğu belirtilmiştir (Capowiez vd. 2003).

Johanson vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada, yaygın olarak kullanılan 6 pestisitlerin toksik etkileri, *Rana temporaria* iribaşlarında araştırılmıştır. Akut toksisite çalışmasında iribaşlar, 72 saat boyunca azoksistrobin, siyanazin, esfenvalerat, MCPA ([4-kloro-2-metilfenoksi] asetik asit), permetrin ve pirimikarbın yüksek dozlarına maruz bırakılmıştır. Kronik toksisite çalışmalarında ise döllemeden metamorfoza kadar azoksistrobin, permetrin ve siyanazinin İsviçre'deki tarımsal arazilerin yüzey sularında bulunabilecek dozları kullanılmıştır. Akut toksisite çalışmasında en ölümcül pestisitlerin azoksistrobin, permetrin ve pirimikarb olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca, azoksistrobin, permetrin ve siyanazinin iribaşların gelişimi üzerinde negatif etkileri görülmüştür. En düşük pestisit konsantrasyonlarında gerçekleştirilen kronik toksisite çalışmalarının, ölüme ya da gelişimde herhangi aksaklığa neden olmadığı bildirilmiştir.

Jemec vd. (2007), IMI ve ticari formülasyonu olan Confidor SL 200'ün *Daphnia magna*'nın biyokimyasal, üreme ve yaşam parametreleri üzerine kronik etkilerini incelemişler ve bu pestisitlerin, artan konsantrasyonlarına maruz kalan bu canlıda, ChE, GST ve CAT enzim aktivitelerini düşürdüğünü rapor etmişlerdir.

Bir neonikotinoid insektisit olan thiaklopridin (THI)'in *Daphnia magna*, *Asellus aquaticus*, *Gammarus pulex*, *Simpetrum striolatum*, *Culex pipiens*, *Notidobia ciliaris* ve *Simulium latigonium* gibi tatlısu böcek ve kabuklu türlerinde hem kısa

vadeli (24 saat) hem de maruziyet sonrası 11-30 günlük gözlemi kapsayan uzun vadeli etkilerinin karşılaştırıldığı bir çalışmada, LC₅₀ değerleri sırasıyla 4,400, 153, 190, 31.2, 6.78, 5.47 ve 5.76 µg/L olarak bulunmuştur. Maruziyeti takiben yapılan 11-30 günlük gözlem sonucu duyarlılık büyüklüğü, *Daphnia magna* < *Asellus aquaticus* = *Gammarus pulex* < *Simpetrum striolatum* < *Culex pipiens* = *Notidobia ciliaris* = *Simulium latigonium* şeklinde tayin edilmiştir. Ayrıca, maruziyetten 4 ile 12 gün sonra thiaklopridin letal ve subletal etkilerinde gecikme meydana geldiği ve kısa vadeli maruziyet (24 saat) sonucu elde edilen LC₅₀ ile maruziyet sonrası en uzun (11-30 d) gözlem sonucu elde edilen değer arasındaki farkın 50 kattan daha fazla olduğu bildirilmiştir. Maruziyet sonrası yapılan inceleme boyunca oluşabilecek gecikmeli etkilerin göz önünde bulundurulması, toksik etkilerin gerçekçi bir şekilde yorumlanması için gerekli olduğu bu çalışmada gösterilmiştir (Beketov ve Liess, 2008b).

Neonikotinoid bir insektisit olan asetamipridin ticari formülasyonu mospilan'ın değişik konsantrasyonlarına maruz bırakılan tatlı su midyesi *Anadonta cygnea*'nın sindirim kanalı ve solungaç dokusunda SOD aktivitesinin ve GSH miktarının azaldığı, lipid peroksidasyonunun ise arttığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, acetamipridin AChE aktivitesinde bir değişime neden olmadığı çalışmada tespit edilmiştir (Mishchuk ve Stolyar, 2008).

Osterauer ve Köhler (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, zebra balıklarının (*Danio rerio*) embriyonik gelişimleri üzerine fiziksel stresör olarak sıcaklık ve insektisitlerin (THI ve diazinon) kombine etkileri incelenmiştir. Erken yaşam evreleri, 5 farklı konsantrasyon (thiakloprid: 1, 5, 10, 15 ve 20 mg/L; diazinon: 100, 500, 1000, 2000 ve 3000 µg/L) ve değişen sıcaklık aralıklarına (28, 30 ve 33.5 °C, kontrol grubu 26 °C) 72 ya da 96 saat boyunca maruz bırakılmıştır. THI'nın, kalp hızı dışında yaşamın erken evre parametreleri üzerine hiçbir etkisi bulunamamış ve bu etkinin kirletici maruziyeti sonucu artan metabolizmadan kaynaklandığı düşünülmüştür. Diazinon maruziyeti, artan sıcaklığa bağlı olarak şiddetli bir mortalite göstermiştir. Test edilen sıcaklık aralığı içinde özellikle diazinonun 2000 ve 3000 µg/L konsantrasyonlarında iribaşlarda kalp hızında artış, yol kesesi ve kalp kesesinde ödem, omurga deformasyonları ve ölüm oranında artış gözlenmiştir. Bağımsız değişkenler olarak ısı ve madde konsantrasyonu karışımlarının doza bağlı olarak sinerjistik etki gösterdiği bildirilmiştir.

IMI insektisitinin *Mytilus galloprovincialis* midye türünde neden olduğu toksisiteye ait biyokimyasal değişimlerin değerlendirildiği diğer bir çalışmada, AChE aktivitesinin solungaç dokusunda azaldığı, neonikotinoid thiakloprid etkisinde ya da her ikisinin kombinasyonunda ise aktivitenin arttığı belirlenmiştir. Buna göre ChE'ların neonikotinoidlere yanıtının türe-özümlü olduğu belirtilmiştir (Dondero vd. 2010).

Kumar vd. (2010) tarafından yapılan bir çalışmada, bir tatlısu balığı olan *Channa punctatus*'un karaciğer, beyin, solungaç, kas ve böbrek enzimleri üzerine thiamethoksamın 24, 48, 72 ve 96 saatlik subletal dozlarının etkisi incelenmiştir. Bu çalışma sonucunda, farklı dokularda artan nötral ve alkalın proteaz aktivitesinin enerji kaynaklarında meydana gelen bozulma sonucu oluştuğu ve alkalın proteaz aktivitesinin yüksek protein hasar göstergesi olarak kullanılabileceği tespit edilmiştir. Ayrıca, thiamethoksam maruziyeti sonucunda, aspartat amino transferaz (AST), alanin amino transferaz (ALT) ve glutamat dehidrojenaz aktivitelerinin arttığı rapor edilmiştir.

Subkütan (deri altından) uygulanan neonikotinoid insektisid thiamethoksamın subkronik etkisinde, sıçanların beyin dokusunda AChE aktivitesi azalmıştır. Bu etkinin ana bileşikten mi yoksa metabolitlerinden mi kaynaklandığını belirleyebilmek için ileri çalışmalara gereksinim duyulduğu belirtilmiştir (Rodrigues vd. 2010).

Bir neonikotinoid insektisit olan IMI'nin kısa süreli etkisine maruz kalan tatlı su balığı *Cyprinus carpio*'un karaciğerinde, GSH miktarı artarken uzun vadeli maruziyette ise inhibisyona neden olmuştur. Ayrıca, karaciğer ve beyinde lipid peroksidasyonu ile protein karbonil miktarında artış, karaciğerde total protein miktarında ise azalma olduğu rapor edilmiştir. (Serbes, 2011).

Bayci (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, yeşil kurbağa *Rana clamitans* iribaşları, IMI'nin farklı konsantrasyonlarına maruz bırakılmış ve iribaşların hayatta kalma, büyüme, gelişim ve davranışlarındaki değişimler incelenmiştir. İribaşların büyüme ve gelişimleri üzerine IMI'nin herhangi bir etkisinin olmadığı bildirilmiştir. Bununla birlikte, insektisit en yüksek iki dozuna (200 mg/L ve 400 mg/L) maruz bırakılan iribaşlarda gözlenen hayatta kalma ve davranışsal etkiler, sinirlerin aşırı uyarılmasına bağlı olarak ortaya çıkan felç ve/veya ölüm olarak tespit edilmiştir.

Neonikotinoid bir insektisit olan asetamipride oral olarak maruz bırakılan farelerin testis dokusunda lipid peroksidasyonu ve nitrik oksit düzeyinin arttığı, CAT, GPx ve SOD enzim aktivitelerinin azaldığı ve asetamiprid metabolitlerinin testislerde oksidatif stres yoluyla üreme işlevlerine hasar verebileceği rapor edilmiştir. (Zhang vd. 2011).

Neonikotinoid THI'nın akut ve subakut etkisinde, sıçan dalak, kemik iliği ve timus dokularında lipid peroksidasyonu artarken, GSH miktarı, CAT ve GPx aktiviteleri azalmıştır. SOD aktivitesinin dalak ve kemik iliğinde artış gösterdiği, GST aktivitesinin ise yalnız timus dokusunda azaldığı belirlenmiştir. Böbrek hasarı ile ilişkili serum üre ve kreatinin düzeylerinin de arttığı ve antioksidan savunmanın bu pestisidin metabolizması sırasında üretilen oksidatif moleküller nedeniyle zayıflamış olabileceği bildirilmiştir (Aydin 2011).

IMI ve onun türevi olan 6-kloronikotinik asitin bir kabuklu amfipod olan *Gammarus fossarum*'da neden olduğu oksidatif stres yanıtları ve davranış değişiklikleri ile bir tatlı su algı olan *Desmodesmus*'un büyüme oranı üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 6-kloronikotinik asitin lipid peroksidasyon düzeyini değiştirmeksizin sadece antioksidan mekanizmayı (CAT) önemli derecede etkilediği, fakat tüm konsantrasyonların GST ve AChE inhibisyonuna neden olmadığını tespit edilmiştir (Malev vd., 2012).

Neonikotinoid insektisit olan thiamethoksamın farklı subletal konsantrasyonlarına (2.6, 5.1, 51.2 ng/arı) 48 saat boyunca maruz bırakılan bal arılarında biyobelirteç olarak çeşitli enzim yanıtları, Beneteau vd. (2012) tarafından incelenmiştir. CAT, GST ve AChE aktivitelerindeki değişimler, 60 gün boyunca ekstraksiyon yapılarak araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, CAT, GST ve AChE enzimlerinin thiamethoksam toksisitesi için uygun biyobelirteçler olduğu sonucuna varılmıştır.

Yeni bir neonikotinoid insektisit olan guadipirin'in *Daphnia magna* türü üzerine etkisinin değerlendirildiği bir toksisite çalışmasında, insektisit 48 saatlik maruziyeti sonucu EC₅₀ değeri 13.01 mg/L olarak belirlenmiştir. Bu süre içinde AChE ve GST aktivitesi önemli ölçüde artırdığı halde, CAT aktivitesinde bariz bir etki görülmemiştir. Bu sonuçlar ışığında guadipirin'in dafnialar için kısmen toksik olduğu bildirilmiştir (Qi vd, 2013).

Strobilurin grubu fungusit olan trifloksistrobinin (TFS) toksisite parametrelerini ve avlanma oranı üzerine etkilerini araştırmak amacıyla, bir balığın (*Synbranchus marmoratus*) avcı, dört Anura türüne (*Rhinella arenarum*, *Physalaemus santafecinus*, *Leptodactylus latrans* ve *Elachistocleis bicolor*) ait iribaşların ise av olarak kullanıldığı bir çalışmada, dört iribaş türünde TFS'nin eşit toksik etki göstermediği belirtilmiştir. En hassas türün *Elachistocleis bicolor* olduğu ve bu türü *P. santafecinus*, *R. arenarum* ve *L. Latrans*'nin takip ettiği tespit edilmiştir. Avlanma oranları, bu fungusite maruz bırakılmış ve bırakılmamış av-avcı karışımları gibi farklı uygulamalar kullanılarak değerlendirilmiştir. TFS'nin av hareketlerini sınırlandırmasından dolayı, balık-iribaş etkileşim sonucunu değerletirdiği çalışmada gösterilmiştir. Avcının avı algılaması azaldığından, iribaşların hayatta kalma şansı artmış, bununla birlikte değerlendirilen dönem boyunca balığın neredeyse TFS'ye maruz bırakılan iribaşlardan kaçınarak maruz bırakılmamış iribaşlar üzerinden beslendiği vurgulanmıştır. Avlanma oranları, iribaş türleri arasında farklılık göstermiş ve bu farklılıkların TFS maruziyetinden ziyade, türler arasındaki davranışsal farklılıktan kaynaklandığı ifade edilmiştir. Subletal TFS konsantrasyonlarının iribaş davranışlarında değerikliğe neden olabileceği ve bu durumun da av-avcı etkileşimini dolaylı olarak etkileyebileceği açıklanmıştır (Junges vd., 2012).

Üç strobilurin fungusite ait formülasyon (Headline, Stratego ve Quilt) ve aktif içeriğinin (AI) (piraklostrobin, propikonazol, trifloksistrobin ve azoksistrobin) akut toksisite etkilerini *Bufo cognatus* iribaşlarında, dört konsantrasyon ve bir kontrol grubu kullanarak karşılaştıran bir araştırmada, bütün fungusitlerin formülasyon ve AI'larının iribaşlar için toksik etki gösterdiği ve en yüksek dozlarda Headline ve Stratego formülasyonlarının %100 mortaliteye neden olduğu belirtilmiştir. Quilt formülasyonu ile onun AI'ine, maruz bırakılan iribaşlarda % 50 ile 60 arasında ölüme sahip olduğu tespit edilmiştir. Sonuçlar, AI'lerin, Quilt ve Stratego için en ölümcül yanıtlardan sorumlu olduğunu göstermiştir. Headline ile yapılan uygulamalar sonucu, AI'in çevreyle ilgili konsantrasyonlarda iribaşlar için toksisite gösterdiği, ayrıca Headline ticari formülasyonu içerisinde bulunan yardımcı maddelerin fungusitin daha toksik olmasına yardımcı olarak mortaliteye katkıda bulunduğu ileri sürölmüştür (Hooser vd., 2012).

Bir strobilurin fungusit olan azoksistrobinin oluşumu ve etkileri üzerine geniş bir literatür taraması yapılan derlemede, bu fungusitin sucul ekosistemlerdeki dirençliliği ve bilimsel veri tabanındaki boşluğu gidermek amaçlanmış, analitik prosedürler, mevcut mevzuatlar ve düzenlemeler de değerlendirilmiştir. Toplanan veriler, azoksistrobinin çevredeki çoğu metabolitleri için uygun analitik referans standartlara ihtiyaç olduğunu ortaya koymuştur. Sediment ve sucul organizmaların dokuları gibi karmaşık matrisler için doğrulayıcı yöntemlerin oldukça sınırlı olduğu, nehir ağzı - deniz gibi doğal ekosistemlerde, azoksistrobin ve metabolitlerinin bazal değerleri ile ilgili bir bilginin bulunmadığı gösterilmiştir (Rodrigues vd., 2013).

2.2. Diğer Pestisit ve Kimyasallarla Yapılan Çalışmalar

C. carpio'nun farklı dokularında, yaygın olarak kullanılan organofosfat insektisit diazinonun oksidatif stres ve asetilkolin esteraz üzerine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, diazinonun subletal konsantrasyonlarına (0.0036, 0.018 ve 0.036 ppb) 5, 15 ve 30 gün boyunca maruz bırakılan *C. carpio*'nun biyokimyasal stres yanıtları spektrofotometrik olarak solungaç, kas ve böbrek dokularında AChE, Na⁺/K⁺-ATPaz, SOD, CAT ve GPx aktiviteleri ile malondialdehit (MDA) ve protein içerikleri ölçülmüştür. Sonuçlar, solungaç ve kas dokularında AChE, kas ve böbrek dokularında Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitelerinin azaldığı, antioksidan enzimlerden ise özellikle SOD'un solungaç, böbrek ve kas dokularında artış gösterdiği rapor edilmiştir. 15 günlük maruziyete kadar diazinon dozu yavaş yavaş artırıldığından dolayı, protein içeriğinin sadece solungaç dokusunda azalış gösterdiği belirtilmiştir. 15 ve 30 günlük maruziyet periyodu sırasında balıklardaki protein düzeyinin kontrol grubundakine ulaştığı gözlenmiştir. Bu çalışma, dokulardaki farklı antioksidan düzeylerine bağlı olarak, pestisit maruziyeti sonucu ortaya çıkan oksidatif stresi nötralize etmek için, *C. carpio*'nun dokuya özgü adaptif yanıt oluşturduğunu ortaya koymuştur (Oruç ve Usta, 2007).

Agrahari ve Gopal (2008) tarafından yapılan bir çalışmada, bir tatlı su balığı olan *Channa punctatus*, organofosfat insektisit monokrotofosun 96 saatlik LC₅₀ değerine bağlı olarak seçilen iki subletal konsantrasyonuna (LC₅₀/10 = 1.86 mg/L ve LC₅₀/20 = 0.96 mg/L) 15 ve 60 gün boyunca maruz bırakılmıştır. Monokrotofosun karaciğer, böbrek, kas, bağırsak, beyin, kalp ve solungaç Na⁺/K⁺-ATPazı üzerine

etkisinin araştırıldığı bu çalışmanın sonucunda, dokulardaki Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi üzerinde insektisit önemli bir inhibitör etkisine sahip olduğu gösterilmiştir. 0.96 mg/L'lik subletal konsantrasyonda inhibisyon oranları solungaç (70%) > böbrekler (63%) > beyin (57%) > bağırsak (52%) > karaciğer (50%) > kas (47%) > kalp (44%) olarak, 1.86 mg/L'lik subletal konsantrasyonda ise solungaç (90%) > kalp (78%) > böbrek (78%) > kas (74%) > bağırsak (71%) > beyin (67%) > karaciğer (63%) olarak tespit edilmiştir. Ayrıca, maruziyet süresinin, enzim inhibisyonunda dozdan daha önemli olduğu belirtilmiştir.

Poliklorlu bifenil (PCB) pestisitlerden Aroklor 1254'ün oksidatif stres etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 35/36. evredeki *Xenopus laevis* iribaşları kullanılmıştır. Aroklor 1254'ün çevrede bulunabilecek dozlarına (0.1 ve 1 mg/L) maruz bırakılan iribaşlarda lipid peroksidasyon (LPO) ve antioksidan sistemler (SOD, CAT, GST, GPx, GR aktiviteleri ve toplam GSH düzeyi) araştırılmıştır. Her iki konsantrasyon maruziyetinin, ortalama vücut ağırlığını azaltırken, canlılık ve gelişim üzerine etki göstermediği belirtilmiştir. Kontrol ve DMSO grubuna göre SOD ve GST aktivitesi, istatistiksel açıdan önemli ($p < 0.05$) bir şekilde artış gösterirken, diğer antioksidan enzim aktivitelerinde ve LPO değişimlerinde anlamlı bir fark görülmemiştir. Gelişimin erken evrelerindeki *X. laevis* iribaşlarının antioksidan sistemlerdeki değişimlerin değerlendirilmesine ışık tuttuğu vurgulanmıştır (Gillardin vd., 2009).

Propikonazolun (PCZ) subletal dozlarına (0.2, 50 ve 500 $\mu\text{g/L}$) maruz bırakılan *Oncorhynchus mykiss*'de sindirim enzimleri (proteolitik enzimler ve amilaz), antioksidan yanıtlar (TBARS, CP, SOD, CAT, GR ve GPx) ve enerji metabolizması parametreleri (Na^+/K^+ -ATPaz) gibi çoklu biyobelirteçlerin çalışıldığı bir çalışmada, PCZ'nin 500 $\mu\text{g/L}$ 'lik maruziyetinin ($p < 0.01$) proteolitik enzim ve amilaz aktivitelerini inhibe ettiği, daha düşük PCZ konsantrasyonlarında antioksidan SOD, CAT, ve GPx enzim aktivitelerinin derece derece arttığı (0.2 ve 50 $\mu\text{g/L}$) belirtilmiştir. En yüksek konsantrasyonda ise (500 $\mu\text{g/L}$), oksidatif stres göstergesi olarak, antioksidan enzim aktivitesindeki inhibisyon ile ilişkili olarak, yüksek lipid peroksidasyonu ve protein karbonil oluşumu ($p < 0.05$) gözlenmiştir. Bununla birlikte, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 500 $\mu\text{g/L}$ 'lik PCZ maruziyetinin, balık sindirim sisteminde Na^+/K^+ -ATPazı inhibe ettiği saptanmıştır ($p < 0.01$) (Li vd., 2010).

Serum parametrelerinin çalışıldığı bir çalışmada, nil tilapyası olarak adlandırılan *Oreochromis niloticus*, sentetik bir piretroid olan sipmetrin (CYP) ile esansiyel metal Cu ve esansiyel olmayan metal Pb'ye maruz bırakılmıştır. 0.05 µg/L CYP, 0.05 mg/L Cu ve 0.05 mg/L Pb'ye 4 ve 21 gün boyunca maruz bırakılan balıklarda serum enzim aktiviteleri, metabolit ve iyon değişimleri çalışılmıştır. CYP, Cu ve Pb maruziyetine bağlı olarak, ALT ve AST aktiviteleri her iki uygulama periyodunda artış göstermiştir. 4 ve 21 günlük pestisit maruziyeti sonucu balıklarda LDH ve alkalın fosfataz (ALP) aktivitelerinde artış görülürken, Cu ve Pb'ye maruz bırakılan balıklarda ise aynı enzim aktiviteleri sadece 21 günlük uygulamada artış göstermiştir (Fırat vd., 2011).

Rhinella arenarum iribaş esterazları ve antioksidan enzimleri üzerine Kuzey Patagonya tarım arazilerinde kullanılan azinfos metil (AZM) ve karbarilin (CB) etkilerinin incelendiği bir çalışmada, iribaşlar 48 saat boyunca 3 ve 6 mg/L AM, 10 ve 20 mg/L CB'ye iribaşlar maruz bırakılmıştır. Çalışmada, CaE ve AChE aktivitelerinin kuvvetli bir şekilde AZM ve CB tarafından inhibe edildiği, GST aktivitesinin ise önemli derecede indüklendiği vurgulanmıştır. GST aktivite artışının, AZM ve CB maruziyetine karşı önemli bir adaptif yanıt oluşturduğu, bunun nedeni olarak da bu enzimin pestisit etkisinin gideriminde rol almasından kaynaklandığı bildirilmiştir. 6 mg/L AZM'ye maruz kalmış iribaşlarda, SOD aktivitesi artış gösterirken, CAT aktivitesi her iki pestisit tarafından önemli ölçüde inhibe edilmiştir. Pestisit maruziyetinin GR ve GPx aktivitesini istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde etkilemediği belirtilmiştir. *R. arenarum* iribaşlarında esterazlar ile birlikte CAT ve GST enzimlerinin, CB ve AZM maruziyeti için uygun biyobelirteçler olduğu bu çalışmada rapor edilmiştir (Ferrari vd., 2011).

Rhinella arenarum iribaşlarının Glifosat (CF-GLY) içerikli dört herbisit formülasyonuna (Roundup Ultra-Max (ULT), Infosato (INF), Glifoglex ve C-K YUYOS FAV) maruz bırakıldığı bir çalışmada, 6-48 saatlik akut toksisite etkilerinin ortaya konulması için kontrol, 1.85, 3.75, 7.5, 15, 30, 60, 120 ve 240 mg ae (asit eşdeğeri)/L konsantrasyonları kullanılmış ve AChE, BChE (butiril kolin esteraz), CaE ve GST aktiviteleri ölçülmüştür. Statik olarak CF-GLY'e maruz bırakılan iribaşlarda 48 saatlik LC₅₀ değerlerinin, 2.42 mg ae/L (ULT) ile 77.52 mg ae/L (FAV) arasında değiştiği belirlenmiştir. 24 saatlik maruziyette LC₅₀ değerleri, bütün CF-GLY formülasyonları için saptanmıştır. 48 saat boyunca bütün CF-GLY

konsantrasyonlarına maruz bırakılmış iribaşlarda AChE, BChE, CaE ve GST aktivitelerinde azalış görülmüştür. Bu inhibisyonlar; AChE için (kontrol = 17.50 ± 2.23 nmol/min/mg/protein) maksimum inhibisyon INF 30 mg ae/L uygulamasında %71.52, BChE için (kontrol = 6.31 ± 0.86 nmol/min/mg/protein) maksimum inhibisyon INF 15 mg ae/L uygulamasında %78.84, CaE için (kontrol = 4.39 ± 0.46 nmol/min/mg/protein) maksimum inhibisyon INF 15 mg ae/L uygulamasında %81.18, GST için (kontrol = 4.86 ± 0.49 nmol/min/mg/protein) maksimum inhibisyon INF 1.87 mg ae/L uygulamasında %86.12 bulunmuştur. Bu sonuçlar, CF-GLY'nin büyük oranda toksisite gösterdiği ve bütün enzim parametrelerinin *R. arenarum* iribaşlar için uygun erken uyarı belirteçleri olduğunu göstermiştir (Lajmanovich vd., 2011).

Kentsel, evsel ve endüstriyel atıkların hiçbir arıtıma tabii tutulmadan boşaltıldığı Meksika platosundaki Yurira Gölü ve bu gölü besleyen ırmak kollarının suyuna 96 saat boyunca maruz bırakılan *Goodea atripinnis* türü balıklar ile yapılan bir çalışmada, kullanılacak olan sular (ağır metal, organoklorlu ve aromatik hidrokarbonlu pestisitlerin yoğun olarak bulunduğu) 2005 yılının Mart ve Haziran aylarında 3 bölgeden (Y:limnetik zon, L: göle dökülen Lerma ırmak kolu, C: göle dökülen le Cinta ırmak kolu) toplanmıştır. Bu sulara maruz bırakılan balıkların karaciğerinde SOD, CAT, GPx gibi antioksidan enzim aktiviteleri, Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi, lipid peroksidasyon (LPO) değişimleri ile göl suyuna ait fiziksel ve kimyasal parametreler analiz edilmiştir. Kontrol grupları ile karşılaştırıldığında, her üç bölge suyuna maruz bırakılan balıklarda GPx ve SOD aktivitelerinde istatistiksel açıdan ($p < 0.05$) önemli bir inhibisyon, CAT aktivitesi ve LPO düzeylerinde ise artış ($p < 0.05$) belirlenmiştir. Mart ve Haziran aylarında limnetik bölgeden toplanan sulara maruz bırakılmış balıklarda Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesi kontrol grubuna benzerlik gösterirken, Mart ayında L ve C bölgelerinden toplanmış sulara maruz kalan balıklarda ise aktivite kontrol grubundan daha yüksek ($p < 0.05$) bulunmuştur. Haziran ayında L bölgesinden toplanan göl suyuna maruz kalan *G. atripinnis* türü balıklarda, Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin, kontrol grubundakinden daha düşük olduğu gösterilmiştir ($p < 0.05$). Mart döneminde sırasıyla L ve Y bölgeleri için CAT ve Na^+/K^+ -ATPaz aktivitelerinin Haziran ayındakine göre artış gösterdiği, Haziran döneminde ise Mart ayı ile karşılaştırıldığında sırasıyla L ve Y bölgeleri için SOD ve

GPx aktivitelerinin neredeyse %100 inhibisyona uğradığı bildirilmiştir (Lopez-Lopez vd., 2011).

Atlı ve Canlı (2011b) tarafından yapılan bir çalışmada, tatlisu balığı *Oreochromis niloticus*, farklı derişimlerdeki (0; 0.1; 0.5; 1.0; 1.5 µg/mL) Cu⁺², Cd⁺², Cr⁺⁶, Ag⁺ ve Zn⁺²'ye 96 saat boyunca ve aynı metallerin 0.05 µg/mL'lik derişimlerine ise 0, 5, 10, 20 ve 30 gün süreyle maruz bırakılmıştır. Deney süreleri sonunda, solungaç, böbrek ve kas dokularında Na⁺/K⁺-ATPaz, Mg⁺²-ATPaz, toplam-ATPaz, Ca⁺²-ATPaz enzim aktiviteleri ile toplam protein, metal ve iyon düzeyleri (Na⁺, K⁺, Ca⁺², Mg⁺²) ölçülmüştür. Kronik uygulamalarda, Ag⁺ hariç hiçbir metalin 30 günlük sürede letal etki göstermediği belirtilmiştir. Ag⁺ etkisinde kalan bütün balıkların 16. günün sonunda öldüğü rapor edilmiştir. Akut ve kronik uygulamalar ile *in vivo* ve *in vitro* koşullarda, metallerin Na⁺/K⁺-ATPaz ile Ca⁺²-ATPaz aktivitesini azalttığı, toplam-ATPaz ile Mg⁺²-ATPaz aktivitesinde ise azalış yanında artışa da neden olduğu gösterilmiştir.

Atrazin (ATR) ve klorpirifos'a (CPF) 40 gün boyunca birebir ve karışım halinde maruz bırakılan *C. carpio*'nun karaciğer ve solungaç dokularında oksidatif stres yanıtı ile histopatolojik değişimlerin incelendiği bir çalışmada, balıklar ayrıca 20 gün boyunca geri dönüşümlü uygulamasına maruz bırakılmışlardır. ATR ve CPF'nin 40 günlük karışım ve birebir uygulamaları sonucunda, karaciğer ve solungaç dokularında doza bağımlı bir şekilde antioksidan enzim aktivitelerinin (SOD, CAT ve GPx) azaldığı, malondialdehit (MDA) içeriğinde ise artış olduğu çalışmada belirtilmiştir. 20 günlük recovery maruziyeti sonrasında, antioksidan enzim aktivitelerinin ve MDA içeriğinin, daha düşük dozlar dışında en yüksek dozların hepsine karşılık gelen uygulama gruplarındakinden istatistiksel olarak (p<0.05) daha düşük olduğu bulunmuştur. Bu çalışmanın balıklarda oksidatif stresi indükleyen ATR, CPF ve ATR/CPF karışım maruziyetinin mekanizmasının anlaşılmasına yardımcı olduğu belirtilmiştir (Xing vd., 2012).

Aydın-Sinan vd. (2012) tarafından yapılan bir çalışmada, 46. evredeki *X. laevis* iribaşları 168 saat boyunca, piretroid insektisitler olan deltametrin ve λ-siyahalotrine maruz bırakılmış ve bu süre sonucunda LC₅₀ değerleri sırasıyla 6.26 ve 3.94 µg AI/L olarak bulunmuştur. 24 saatlik pestisit maruziyeti sonucunda zehirlenmenin erken belirtilerini gösterebilmek için GST, CaE, AChE, LDH, ACP ve

AST enzim aktiviteleri değerlendirilmiştir. Her iki insektisit, ACP ve AST aktivitelerinde inhibisyona neden olmuştur. GST, CaE ve LDH aktivitelerinde inhibisyona neden olan λ -siyahalotrinin aksine, deltametrin AChE aktivitesinde artışa yol açmıştır. Sonuçta, *X. laevis*'in test edilen piretroidlere karşı duyarlı olduğu ve enzimsel yanıtların, piretroid insektisitlere ait toksik etkinin doğal koşullarda bulunan amfibilerde değerlendirilmesi için potansiyel biyobelirteçler olduğu vurgulanmıştır.

Endüstriyel ve tarımsal kirliliğin yoğun olduğu Meriç Deltası'nda yaşayan *C. carpio* türü balıklarda, sucul çevrede yaygın olarak bulunan ve kalıcılığı yüksek olan organoklorlu pestisit (OCPs) etkilerinin değerlendirildiği bir çalışmada, çeşitli biyobelirteç aktiviteleri değerlendirilmiştir. Balıklar, dört örnekleme döneminde, kontaminasyonun yoğun olduğu ve kirliliğin nispeten daha az olduğu bölgelerden elde edilmiştir. Balıklarda biyobelirteç olarak, hepatik GST, CaE, LDH, AST ve ACP aktiviteleri ölçülmüştür. Meriç ve Ergene nehirlerinin birleşme bölgelerinden elde edilen balıkların hepatik GST aktivitelerinde artış bulunurken, Enez bölgesinden toplanan balıklarda ise bir azalış rapor edilmiştir. Bu çalışmada, GST ve CaE'in çevresel kirleticilerin değerlendirilmesinde biyobelirteç olarak kullanılabileceği vurgulanmıştır (Güngördü vd., 2012).

Pestisitlerin hedef olmayan organizmalar üzerindeki toksik etkilerini belirlemek için yapılan bir laboratuvar çalışmasında, glifosat ve methidatyonun toksik etkileri, *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis* ve *X. laevis* olmak üzere üç anura türünün erken gelişim evrelerinde karşılaştırmalı olarak değerlendirilmiştir. Glifosat ve methidatyonun 96 saatlik LC₅₀ değerleri, *P. viridis* iribaşları için 25.7–19.6 mg aktif içerik (AI)/L; *P. ridibundus* iribaşları için 27.4–22.7 mg AI/L ve *X. laevis* iribaşları için 15.3–5.05 mg AI/L bulunmuştur. Toksik etkinin erken belirtileri olarak, GST, AChE, CaE, GR, LDH ve AST enzim aktiviteleri, 96 saat pestisitlere maruz kalan 4 günlük iribaşlarda tayin edilmiştir. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, 3.2 mg AI/L methidatyon dozuna maruz kalan *P. ridibundus*, *P. viridis* ve *X. laevis* iribaşları için sırasıyla %173, %83 ve %38 oranında GST aktivitesinin indüklendiği, AChE aktivitesinin ise % 86, % 96 ve %30 oranında inhibe ettiği gösterilmiştir. Methidatyon maruziyetinin aksine, glifosat maruziyetinin kontrol grubuna göre bütün enzim aktivitelerinde istatistiksel olarak önemli artışlar gösterdiği rapor edilmiştir. 3.2 mg AI/L glifosat maruziyeti

sonrasında, GST ve AChE aktivitelerindeki artış düzeyleri, *P. ridibundus* için sırasıyla %111 ve % 31; *P. viridis* için %13 ve %51 ve *X. laevis* için %15 ve %36 olarak bildirilmiştir. Erken uyarı indikatörleri olarak AChE, CaE ve GST'nin, anuran iribaşlarında bu pestisitlerin toksik mekanizmalarının anlaşılması için uygun biyobelirteç enzimler olduğu gösterilmiştir (Güngördü, 2013).

Güngördü vd. (2013b) tarafından yapılan bir çalışmada, yeni sentez edilmiş benzimidazol kökenli sekiz organofosfor (OP) bileşiğin toksik özellikleri, 46. evredeki *X. laevis* iribaşlarında *in vivo* ve *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Her iki uygulama için referans bileşik olarak azinfos metilin (AZM) ticari solüsyonu kullanılmıştır. Test edilen bileşiklerin hepsi için 46. evredeki iribaşlarda, 24 saatlik LC₅₀ değerleri 9.54-140 µM aralığında belirlenmiştir. Bileşiklerin lethal etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla, *in vivo* koşullarda *X. laevis* iribaşları, bileşiklerin LC₅₀, LC_{50/2} ve LC_{50/4} konsantrasyonlarına maruz bırakılmış ve biyobelirteç olarak AChE, CaE, GST, GPx, GR, LDH, AST ve ALT enzim aktiviteleri değerlendirilmiştir. *in vivo* uygulama koşullarında, belirlenen dozlara maruz bırakılan iribaşlarda, AZM ve test edilen sekiz OP bileşikten yedisinin CaE inhibisyonuna neden olduğu, diğer enzim biyobelirteçlerinde ise OP bileşiğine ve doza bağlı olarak aktivitelerde inhibisyon ve artışlar görüldüğü belirtilmiştir. Bununla birlikte, 30 dakikalık *in vitro* maruziyet koşullarında, ticari olarak satılan elektrikli yılanbalığı (*Electrophorus electricus*) AChE'ı ve *X. laevis* homojenatları kullanılarak sekiz OP bileşiğin AChE inhibisyon kapasitesi tayin edilmiştir. CaE inhibisyon kapasitesi ise sadece *X. laevis* homojenatlarında tayin edilmiştir. *in vitro* maruziyet koşullarında Sekiz OP bileşiğin AChE aktivitesinde %23'den fazla inhibisyona neden olmadığı belirtilen bu çalışmada, AZM maruziyetinin, *X. laevis* homojenatlarında %26, elektrikli yılanbalığı (*Electrophorus electricus*) AChE aktivitesinde ise %97 inhibisyona neden olduğu vurgulanmıştır. Bununla birlikte aynı koşullarda CaE inhibisyonunun AZM için %46, diğer bileşikler için %8 ile 33 arasında olduğu rapor edilmiştir.

Eroğlu ve Canlı (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, 1 µg/mL derişimindeki Cd⁺² ve Zn⁺²'in ayrı ayrı ve birlikte etkilerine farklı sürelerde (0, 7, 14, 21 ve 28 gün) maruz kalan tatlısu balığı *Oreochromis niloticus*'un farklı dokularında ATPaz grubu enzimlerin (Na⁺/K⁺-ATPaz, Mg⁺²-ATPaz ve Ca⁺²-ATPaz) tepkileri incelenmiştir. Deney süreleri sonunda, balıklarda solungaç dokusunda Na⁺/K⁺-ATPaz, Mg⁺²-ATPaz ve Ca⁺²-ATPaz aktiviteleri ile kas dokusunda Ca⁺²-ATPaz

aktiviteleri ölçülmüştür. Balıklar deney koşullarında 28 gün yaşarken herhangi bir sağlık sorunu gözlenmemiştir. Metallerin ayrı ayrı ve birlikte etkisinde kalan balıklarda solungaç ve kas ATPaz aktivitelerinde bazı önemli değişimler görülmüştür. Buna göre Na^+/K^+ -ATPaz ve Ca^{+2} -ATPaz, aktiviteleri metal türü, metallerin ayrı ayrı ve birlikteki etkileri, etki süresi ve doku tipine bağlı olarak genellikle azalış yönünde bir değişim gösterirken, Mg^{+2} -ATPaz aktivitelerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Balıkların doku protein düzeylerinde ise genel olarak bir değişim görülmemiştir.

Literatürde, seçilen iki pestisit karışımının organizmalar üzerine etkileri konusunda herhangi bir bilgi mevcut değildir. Bu nedenle çalışmalarımızda hem seçilen pestisitlerin etkilerinin tek tek ele alınıp, *X.laevis* gelişimi üzerine toksik etkilerinin ortaya konulması, hem de her iki pestisit karışımının etkilerinin birlikte değerlendirilmesi bakımından önem taşımaktadır ve bu konuda yapılan ilk çalışması olması da çalışmamızın orjinalitesini sağlamaktadır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Çalışmada Kullanılan Pestisitler

Çalışmada sentetik neonikotinoid insektisitlerden Thiakloprid (THI) ((Z)-N-{3-[(6-Chloro-3-pyridinyl)methyl]-1,3-thiazolan-2-yliden}cyanamide) ve strobilurin fungusitlerden Trifloksistrobin (TFS) (methyl (E)-methoxyimino-{(E)-a-[1-(a,a,a-trifluoro-m-tolyl)ethylideneaminoxy]-o-tolyl}acetate) kullanılmıştır. Çalışmalarda kullanılan pestisitlerden Thiakloprid CALYPSO OD 240, Trifloksistrobin ise FLİNT WG 50 ticari adı ile Bayer Türk tarafından üretilen ve pazarlanan preparatlardır.

3.2. *Xenopus laevis* Yumurta ve İribaşlarının Sağlanması

Çalışmada deney hayvanı olarak kullanılan *Xenopus laevis* (Afrika Tırnaklı Kurbağası) türü iribaşlar, İnönü Üniversitesi Biyoloji Bölümü Çevre Toksikolojisi Araştırma Laboratuvarında yaşatılmakta olan koloniden elde edildi. Çalışmada yumurta elde edilirken her seferinde farklı ergin dişi ve erkek *X. laevis* bireyleri kullanıldı. Bu laboratuvarın ortam sıcaklığı devamlı olarak 23±1°C'de tutulmakta olup, deneysel çalışmalar da aynı ortamda yürütüldü ve tüm çalışmalar ergin bireylerin yaşatılmakta olduğu ortam koşullarında sürdürüldü. Ayrıca, çalışma ortamında 12:12 saat aydınlık:karanlık ışık periyodu uygulandı. Çalışmada kontrol amaçlı kullanılan ve içerisinde yumurta ve iribaş gelişiminin sağlandığı FETAX solüsyonu, Tip I ASTM standartlarına uygun şekilde hazırlandı (ASTM, 1998). Buna göre 1 L distile suda 625 mg NaCl, 96 mg NaHCO₃, 30 mg KCl, 15 mg CaCl₂, 60 mg CaSO₄.2H₂O ve 75 mg MgSO₄ olacak şekilde FETAX solüsyonu her kullanımdan önce taze olarak hazırlandı.

Uygulama öncesi yeterli yumurta elde etmek için iki ♂ ve iki ♀ ergin kurbağa 100 x 40 x 60 cm (Boy:En:Derinlik) boyutlarında ayrı akvaryumlara alınarak 48 saat süreyle bekletildi. Spermatogenez ve oogenezi teşvik etmek amacıyla Birhanlı (2003) tarafından uygulanan protokol kullanıldı. Yumurtaların elde edilmesi istenen günden 36 saat önce, iki ♂ kurbağaya 200 IU insan koryonik gonadotropin hormonu (hCG) (Pregnyl® 5000 IU, Organon Türkiye) dorsal lenf bezlerinden enjekte edildi. 36 saatin sonunda iki ♀ kurbağaya 600 IU, önceden hormon uygulanmış iki erkeğe ise 300 IU hCG enjekte edildi. Enjeksiyon için 1 ml'lik insülin enjektörleri (0.3x8 mm) (Becton Dickinson) kullanıldı. Enjeksiyon

tamamlandıktan sonra erkek ve dişi kurbağalar aynı akvaryuma konup, karartma amacıyla akvaryumun üzeri örtüldü ve sessiz bir ortam sağlandı. Hormonal indüksiyonu takiben 2 ile 6 saat sonra amplexus başladı ve 10-16 saat yumurta dökme devam etti. Bu sürelerin bilinmesi ortamdaki yumurtaların bozulmadan alınmasını sağlamaktadır. Sabah erken saatlerden itibaren toplanan yumurtalar ve bu yumurtalardan elde edilen embriyolar 46. evreye ulaşmaya kadar (4 gün 10 saat) içinde FETAX solüsyonu bulunan ve sürekli havalandırılan kaplara alınarak bekletildi. 46. evredeki sağlıklı iribaşlar, daha sonra pestisit toksisitesi çalışmalarında kullanılacak olan 50-58. evreye ulaşmaya kadar içerisinde yine FETAX solüsyonu bulunan 35×25×15 cm boyutlarındaki polietilen propilen tanklara alındı ve 5. günden itibaren beslenmeye başlandı.

İribaşlar herbivor olup, en uygun besin maddesi ıspanaktır. Ispanakların muhtemel toksik maddelerden arındırılması için iyice yıkandı ve temizlendikten sonra haşlanıp püre haline getirilen ıspanakların suyu süzüldü. İribaşlar, 3 günde bir taze olarak hazırlanan ıspanak özütü ile her gün beslendi. Her biri yaklaşık 100 adet iribaş bulunduran tanklar ve içerisindeki FETAX solüsyonu haftada bir olmak üzere temizlenerek değiştirildi. Birey sayısındaki fazlalığın gelişim hızı üzerindeki baskılayıcı etkisini ortadan kaldırmak için kalabalık tanklardaki iribaşlar yeni kaplara alınarak seyreltme işlemi yapıldı.

3.3. Toksikite Testlerinin Uygulanması

3.3.1. Pestisitlerin LC₅₀ Değerlerinin ve Uygulama Konsantrasyonlarının Belirlenmesi

Araştırmada, ortalama letal konsantrasyon (LC₅₀) taraması için 50-58. gelişim evresindeki sağlıklı *Xenopus laevis* iribaşları, THI ve TFS'nin farklı konsantrasyonlarına 96 saat boyunca maruz bırakıldı. Bu amaçla, 350 mL kapasiteli polipropilen plastik şeffaf dikdörtgen kaplar kullanılarak, her bir çalışma kabına 200'er mL pestisit çözeltisi konuldu. Kontrol grubu ve her konsantrasyon için hazırlanan bütün kaplarda 7 adet olacak şekilde iribaş bırakıldı ve toksisite testleri, her doz için 3 tekrarlı yapıldı. Kontrol grubu iribaşlar için ve farklı konsantrasyonlarda pestisit çözeltisi hazırlamak amacıyla FETAX solüsyonu kullanıldı. İribaşlar, pestisit etkisine 96 saat boyunca statik yenilemeli test ortamında maruz bırakıldı. Akut toksisite testinde, her iki pestisite ait 96 saatlik LC₅₀

değerlerini tayin etmek için iribaşlar 24., 48., 72. ve 96. saatlerde kontrol edildi. Ölü ve canlı bireyler saptanıp sayıları kaydedildikten sonra, ölü olan iribaşlar ortamdaki uzaklaştırıldı ve pestisit çözeltileri yenilendi. Kalp atışının durması ve hareketsizlik ölüm kriteri olarak kabul edildi. Dördüncü günün (96. saat) sonunda tüm ölü ve hayatta kalan iribaş sayısı belirlendikten sonra, deney sonlandırıldı. Aralık belirleme deneylerinden sonra bu pestisitler için uygulama konsantrasyonları LC₅₀ değerlerine bağlı olarak belirlendi. Çalışılan her iki pestisit ile ilgili olarak gerek Türk Çevre Mevzuatında gerekse Dünya Sağlık Örgütü (WHO), Avrupa Birliği (EU) ve ABD Çevre Koruma Ajansı (EPA) tarafından kabul edilebilir değer olarak verilen herhangi bir konsantrasyon bulunmamasından dolayı LC₅₀ verileri doğrultusunda, çalışılan pestisitlerin çevrede bulunabilecek düzeylerinin etkisini belirlemek amacıyla LC₅₀, LC_{50/2}, LC_{50/10}, LC_{50/20}, LC_{50/50} ve LC_{50/100} olacak şekilde 6 subletal doz belirlendi.

3.3.2. Subakut Toksikite Deneyleri

THI, TFS ve bunların karışımlarının, *X. laevis* iribaşları üzerindeki letal ve subletal etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla iki farklı uygulama grubu kuruldu. Birinci uygulama grubunda, 50-58. gelişim evresindeki amfibi iribaşları her bir pestisit ve bunların karışımlarının bir seri subletal konsantrasyonuna (LC₅₀, LC_{50/2}, LC_{50/10}, LC_{50/20}, LC_{50/50} ve LC_{50/100}) 96 saat süre ile statik yenilemeli test ortamında maruz bırakıldı. İribaşlar, uygulamanın başlatılmasını takiben 24., 48., 72. ve 96. saatlerde kontrol edildi. Ölü iribaşlar ortamdaki alındıktan ve sayıları kaydedildikten sonra, pestisit çözeltileri yenilendi. İkinci uygulama grubunda ise pestisitlerin 96 saatlik LC₅₀, LC_{50/2}, LC_{50/10}, LC_{50/20}, LC_{50/50} ve LC_{50/100} değerlerinin karışımlarına iribaşlar 24 saat süresince maruz bırakıldı. Her iki uygulama grubunda, her bir konsantrasyon için 3 tekrarlı sistem kuruldu. Bu amaçla, 350 ml kapasiteli plastik kaplara her doz için kendine ait 200 ml pestisit çözeltisi ve 50-58. gelişim evresinde bulunan 7'şer adet iribaş bırakılarak deney düzeneği kuruldu. Her iki uygulama sonunda ortamdaki ölü iribaşlar uzaklaştırıldıktan sonra, kalan iribaşlar ependorf tüplerine aktarıldı ve buz üzerinde uyuşmaları sağlanarak enzim aktivitesinin yapılacağı zamana kadar -80°C'de derin dondurucuda (Thermo, Forma -86°C Ultra-low Temperature Freezer) muhafaza edildi.

3.4. Ortam pH'sının Saptanması

Deneylerde statik yenilemeli test sistemi kullanıldığından, iribaşların maruz kaldıkları ortamın pH değerleri de ölçüldü. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda pestisit çözeltisi bulunan kaplar için 0., 24., 48., 72., ve 96. saatlerdeki pH değerleri periyodik olarak kaydedildi. Böylece toksik etkinin ortamdaki pH değişimine bağlı olarak ortaya çıkıp çıkmadığı saptandı.

3.5. İribaşların Homojenizasyon ve Santrifüj İşlemleri

Örneklerin homojenizasyonuna başlamadan önce, iribaşların bulunduğu ependorf tüpleri buz üzerinde çözülmeye bırakıldı ve su damlacıkları pastör pipeti ile uzaklaştırıldıktan sonra tartıldı. Homojenizasyon toplam iribaş ağırlığının 4 katı hacminde (w/v) soğutulmuş homojenizasyon tamponu (0.1 M, pH 7.4 potasyum fosfat tamponu içinde; 0.15 M KCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT) içinde yapıldı. İribaş örnekleri buz kabı içinde cam-teflon homojenizatör (Heidolph® RZ 2021) kullanılarak, 2000 rpm'de 30 saniye süreyle parçalandı. Homojenizasyon sonrası homojenatlar ependorf tüplerine aktarıldı. Homojenat 4°C'de 16,000 xg devirde 20 dakika süre ile santrifüj (Sigma® 2-16k) edildi. Santrifüj sonrası süpernatant kısmı alınarak S16 fraksiyonlarında enzim aktiviteleri ölçüldü. Çalışmaların tüm aşamalarında örnekler buz içerisinde korundu.

3.6. Enzim Aktivitelerinin Belirlenmesi

Bütün enzim aktivitesi ve toplam protein miktarı ölçüm işlemleri, iribaşların homojenizasyonu ve santrifüj işleminden hemen sonra, örnekler bekletilmeksizin mikropłaka okuyucu sistem (Versamax®, Molecular Devices Corp., USA) kullanılarak yapıldı. Enzim aktivitesi ve toplam protein miktarı ölçümlerinde, her bir örnek için 4 tekrarlı absorbans okuması yapıldı. Aynı örnek için elde edilen değerler arasında % 10'dan daha büyük korelasyon farkı bulunduğunda, okuma işlemi yinelenildi. Bütün enzimlerin aktiviteleri, örneklerdeki toplam protein düzeyleri ölçüldükten sonra spesifik aktivite (nmol/dk/mg total protein) cinsinden ifade edildi.

3.6.1. Glutasyon S-transferaz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında GST aktivitesini belirlemek amacı ile mikrolaka okuyucu sistem kullanıldı. Substrat olarak, %96'lık etanol içinde hazırlanan 20 mM 1-kloro-2,4- dinitrobenzen (CDNB) kullanıldı. Çalışmada Habig vd. (1974)'nin geliştirdiği yöntem, bazı modifikasyonlar yapılarak kullanıldı. Reaksiyonda kofaktör olarak redükte glutasyon (0.002 M) kullanıldı. Mikrolaka kuyucuklarına sırası ile 10 µL süpernatant, 100 µL fosfat tamponu (0.1 M, pH 6.5) + 100 µL GSH karışımı ve son olarak 10 µL CDNB pipetlendi. Karışım mikrolaka okuyucu sisteme yerleştirildikten sonra 15 sn süre ile karıştırıldı ve 25°C'de 2 dakika süre ile 344 nm'de absorbans değişimi kaydedildi. Spesifik GST aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı (344 nm'de CDNB için $\epsilon=9600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.6.2. Glutasyon Redüktaz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında GR aktivitesi tayini mikrolaka sistemi ile ölçüm yöntemine göre yapıldı (Cribb vd., 1989). Reaksiyon solüsyonu 0.1 mM, 150 µL 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB), 1.2 mM, 20 µL NADPH ve 20 µL örnek içermektedir. 20 µL, 3.25 mM GSSG'nin ilavesi ile reaksiyon başlatıldı. Bütün çözeltiler, 1 mM EDTA içeren, 0.1 M potasyum fosfat tamponunda (pH 7.5) hazırlandı. Reaksiyon ilerledikçe GSSG'den GSH oluşumu nedeniyle azalan DTNB miktarı oda sıcaklığında 3 dakika süre ile 405 nm'de izlendi ve elde edilen absorbans değerlerinden spesifik GR aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı. (405 nm'de DTNB için $\epsilon=14151 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.6.3. Glutasyon Peroksidaz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında GPx aktivitesi Bell vd. (1985) tarafından önerilen spektrofotometrik yöntemin modifiye edilmiş ve mikrolaka okuyucu sistemine uyarlanmış şekli kullanıldı. Enzim aktivitesi ölçümünde H₂O₂ substrat olarak, sodyum azid (NaN₃) ise katalaz inhibitörü olarak kullanıldı. Bu amaçla, mikrolaka kuyucuklarına 10 µL süpernatant ve 160 µL 1 mM GSH, 0.1 mM NADPH, 0.32 ünite GSH-redüktaz, 1 mM EDTA, 2 mM NaN₃ içeren 50 mM pH 7.4 fosfat tamponu pipetlendikten sonra bu karışım 20°C'de 6 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra kuyucuklara 30 µL 1.67 mM H₂O₂ pipetlenerek reaksiyon

başlatıldı. NADPH oksidasyonuna bağlı olarak absorbans değişimi 25°C’de 3 dakika süreyle 340 nm’de kaydedildi. Spesifik GPx aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı (340 nm’de NADPH için $\epsilon=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.6.4. Katalaz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında CAT aktivitesi Aebi (1974) tarafından önerilen spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi. Enzim aktivitesinin, 240 nm dalga boyunda substrat olarak kullanılan hidrojen peroksitin (H_2O_2) tüketimine bağlı olarak saptanması amaçlandı. Bu amaçla 1 mL’lik kuvarz küvete, 20 μL örnek ve 480 μL 12.5 mM H_2O_2 içeren 50 mM potasyum fosfat tamponu (pH 7.0) pipetlendi. 25°C’de 1 dakika süreyle absorbans değişimleri, Shimadzu UV-1700 model spektrofotometre ile ölçülerek kaydedildi. Spesifik CAT aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı (240 nm’de H_2O_2 için $43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.6.5. Karboksilesteraz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında CaE aktivitesini belirlemek amacı ile önerilen spektrofotometrik yöntem mikrolaka okuyucu sisteme uyarlandı. Aktivite tayininde 26 mM %96’lık etanol içinde hazırlanan *p*-nitrofenol asetat (PNPA) substrat olarak kullanıldı (Nousiainen and Torronen, 1984; Santhoshkumar and Shivanandappa , 1999). Bu amaçla 5 μL örnek ve 250 μL , 0.05 M trizma pH 7.4 tamponu (Sigma-Aldrich, T7693) kuyucuklu mikrolağa pipetlendi ve 25°C’de 3 dakika ön inkübasyona bırakıldı. Daha sonra, son konsantrasyon 0.5 mM olacak şekilde 5 μL *p*-nitrofenol asetat kuyucuklara ilave edildi ve 2 dakika süreyle 405 nm’de distile suya karşı absorbans değerleri ölçüldü. Spesifik CaE aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı (405 nm’de PNPA için $\epsilon=1830 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.6.6. Asetilkolinesteraz Aktivitesi

S16 fraksiyonlarında AChE aktivitesi spektrofotometrik yöntem ile tayin edildi. Bu amaçla Ellman ve Andres (1961) tarafından kullanılan yöntemin, Özmen vd. (1998) tarafından modifiye edilmiş ve mikrolaka okuyucu sistemine uyarlanmış şekli kullanıldı. Enzim aktivitesi ölçümünde asetiltiyokolin iodid (ACTI) substrat

olarak kullanıldı ve renk değişimine bağlı olarak ürün oluşumu saptandı. İribaşlardan elde edilen süpernatant toplam reaksiyon karışımında 10 µL olacak şekilde mikrolaka kuyucuklarına pipetlendi. Süpernatantın üzerine son reaksiyon karışımında 0.701 mM ACTI ve 0.136 mM DTNB olacak şekilde, 0.1 M trizma pH 8.0 tamponu (Sigma-Aldrich, T8483) içerisinde hazırlanmış karışımından 200 µL ilave edildi. Karışım mikrolaka okuyucuya yerleştirildi ve 10 saniye süreyle çalkalandı. 25°C’de 1 dakika süre ile 412 nm dalga boyunda absorbans değişimi kaydedildi. Spesifik AChE aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı (412 nm’de DTNB için $\epsilon=13600 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.6.7. Laktat Dehidrogenaz Aktivitesi

LDH enzim aktivitesi ölçümünde, 340 nm dalga boyunda LDH diagnostik kiti (Biolabo cod: 92111, BIOLABO., Fransa) kullanıldı (Güngördü, 2007). Toplam reaksiyon karışımında 5 µL süpernatant olacak şekilde mikrolaka kuyucuklarına pipetlendi. Üretici firmanın belirttiği protokole göre, LDH substratının bulunduğu 15 mL’lik tampon çözeltisi içerisinde koenzimin eritilmesi ile hazırlandı. Bu çözeltiden 200 µL, örneklerin üzerine seri olarak çok kanallı mikropipet ile pipetlendi. Karışım 15 saniye süreyle mikrolaka okuyucuda çalkalandı ve 25 °C’de 2 dakika süre ile 340 nm’de absorbans değişimi kaydedildi. Spesifik AChE aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı (NADH için $\epsilon=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.6.8. Aspartat Aminotransferaz Aktivitesi

AST enzim aktivitesi ölçümünde, diagnostik kit (Biolabo cod: 80025, BIOLABO., Fransa) kullanıldı (Güngördü, 2007). Öncelikli olarak 20 µL supernatant örneği mikrolaka çukurlarına pipetlendi. Üretici firmanın belirttiği protokole göre, hazır kite 10 mL distile su eklenerek içerisinde AST substratı bulunan çözelti hazırlandı. Bu çözeltiden örneklerin üzerine 200 µL eklenerek reaksiyon başlatıldı. Absorbans değişimi, 25 °C’de, 340 nm’de 2 dakika süre ile okundu. Spesifik AChE aktivitesi nmol/dk/mg protein cinsinden hesaplandı (NADH için $\epsilon=6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

3.6.9. Alanin Aminotransferaz Aktivitesi

ALT aktivitesi ölçülürken, diagnostik kitler (Biolabo cod: 80027, BIOLABO., Fransa) kullanıldı (Güngördü, 2007). Öncelikli olarak 20 µl örnek mikropilaya çukurlarına pipetlendi. Üretici firmanın belirttiği protokole göre, hazır kite 10 ml distile su eklenerek içerisinde ALT substratı bulunan çözelti hazırlandı. Bu çözümden örneklerin üzerine 200 µl eklenerek reaksiyon karışımı 1 dakika inkübe edildi. İnkübasyon

3.7. ATPaz Enzim Aktiviteleri

3.7.1. ATPaz Aktivite Ölçümünde Kullanılan Kimyasallar

- **Ouabain** (Ouabain oktahidrat, $C_{29}H_{44}O_{12} \cdot 8H_2O$, Sigma),
- **Sodyum klorür** (NaCl, Merck),
- **Potasyum klorür** (KCl, Sigma),
- **Magnezyum klorür** ($MgCl_2$, Sigma),
- **Kalsiyum klorür-2-hidrat** ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$, Merck),
- **EGTA** (Etilen glikol-bis (2-aminoetileter)-N,N,N',N'-tetraasetikasit, Sigma),
- **Tris-Base** (Tris (hidroksimetil)aminometan; $C_4H_{11}NO_3$, Sigma),
- **Polioksietilen 10 Lauril eter** (Dekaetilen glikol monododesil eter ($C_{32}H_{66}O_{11}$), Sigma),
- **Sülfirik asit** (H_2SO_4 % 98, Merck),
- **Potasyum dihidrojen fosfat** (KH_2PO_4 , Merck),
- **Amonyum molibdat**, (Amonyum heptamolibdat tetrahidrat ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$, Merck),
- **ATP** (Adenozin 5'-trifosfat di(tris) dihidrat tuzu ($C_{10}H_{16}N_5O_{13}P_3 \cdot 2C_4H_{11}NO_3 \cdot 2H_2O$), Sigma)

3.7.2. ATPaz Enzim Aktivitelerinin Ölçümü

Adenozin Trifosfatazların aktivitesi, inkübasyon sırasında ortama substrat olarak ilave edilen 3 mM ATP'den açığa çıkan inorganik fosfatın spektrofotometrik olarak ölçülmesi prensibine dayanır (Atkinson vd., 1973; Reading vd.,1980).

Çizelge 3.1. ATPaz enzim aktivitesinin ölçüldüğü ortam koşulları ve inkübasyon ortamındaki iyonların final derişimleri.

Kimyasallar	Toplam-ATPaz (- Ouabain)	Mg²⁺-ATPaz (+ Ouabain)	Ca²⁺-ATPaz (Ca²⁺ Ortamı)
Ouabain (mM)	-	1	-
NaCl (mM)	100	100	-
KCl (mM)	20	20	-
MgCl₂ (mM)	4	4	4
CaCl₂.2H₂O (mM)	-	-	1
EGTA (mM)	-	-	1
Tris (mM)	40	40	40
ATP (mM)	3	3	3
pH	7.7	7.7	7.7
°C	37	37	37

Subletal pestisit konsantrasyonlarına maruz bırakılan iribaşlarda spektrofotometrik ATPaz enzim aktivitesinin belirlenmesi amacıyla Atlı ve Canlı (2011a) tarafından önerilen yöntem, modifiye edilerek kullanıldı. Spektrofotometrik yöntem, mikropilaka okuyucu sisteme (Versamax®, Molecular Devices Corp., USA) uyarlandı. Enzim aktivitelerinin saptanmasında her örnek 1/10 oranında sulandırılarak 3 tekrarlı absorbans okuması yapıldı. Mikropilaka çukurlarına, final derişimleri Çizelge 3.1.'de verilen 60 µL inkübasyon ortamı ve 5 µL süpernatant pipetlenerek, 37 °C'deki etüvde 5 dk inkübe edildi. Mikropilaka çukurlarına 10 µL 3 mM ATP ilave edilerek reaksiyon başlatıldı (Çizelge 3.2.) ve 37 °C'deki etüvde (Nüve ES 120 inkübatör) 30 dk inkübe edildikten sonra seri olarak çok kanallı mikropipet ile 35 µL soğuk saf su (+4 °C) pipetlenerek reaksiyon durduruldu. Tüm bileşenler dışında ATP içermeyen tüpler ATP körü, sadece örnek içermeyen tüpler ise örnek körü olarak kullanıldı (Çizelge 3.2.). Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesi, toplam-ATPaz (ouabain içermeyen) aktivitesinden Mg²⁺-ATPaz (ouabain içeren) aktivitesi değerinin çıkarılması ile hesaplandı. Oubain, Na⁺/K⁺-ATPaz'a bağlanarak

aktivitesini inhibe eder. Bu inhibisyon Mg^{+2} -ATPaz aktivitesinin ölçümüne imkan sağlar. Ca^{+2} -ATPaz aktivitesi ise $CaCl_2$ varlığında ve yokluğunda ölçülen enzim aktiviteleri arasındaki farka dayanarak hesaplandı. Enzim aktiviteleri, $\mu\text{mol Pi/mg prot./sa.}$ cinsinden verildi (Atlı, 2009).

Çizelge 3.2. ATPaz enzimlerinin aktivite analiz şeması.

	Toplam ATPaz	Mg^{+2} ATPaz	Ca^{+2} ATPaz	Örnek Körü	ATP Körü	Kör
- Ouabain İnk. Ortamı	60	-	-	60	60	60
+ Ouabain İnk. Ortamı	-	60	-	-	-	-
Ca^{+2} Ortamı	-	-	60	-	-	-
Örnek Süpernatant	5	5	5	-	5	-
dH₂O	-	-	-	5	10	15
ATP	10	10	10	10	-	-

3.7.3. İnorganik Fosfat Tayini

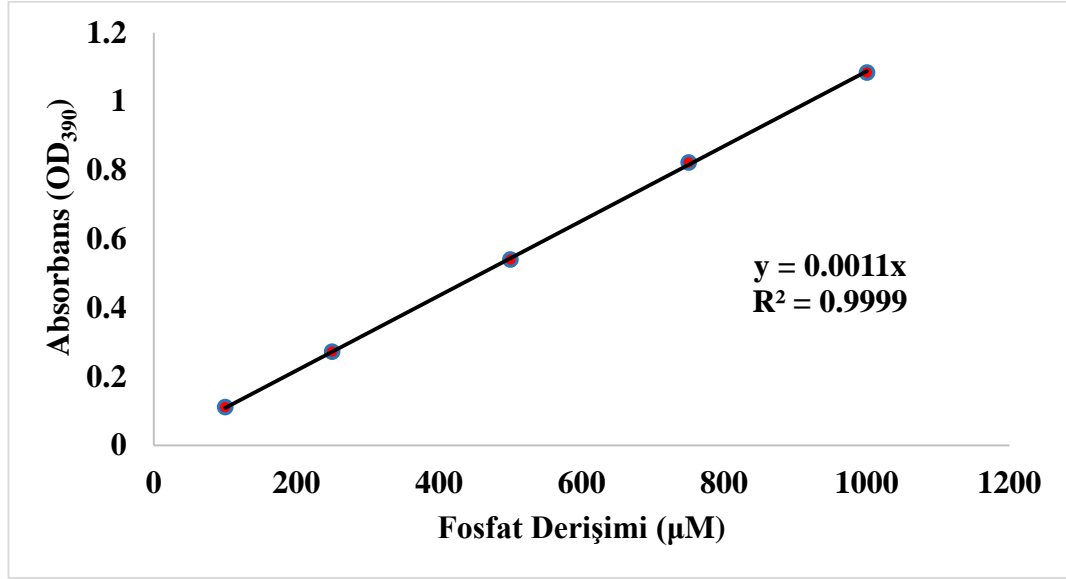
Reaksiyon sonunda ATP'den açığa çıkan Pi'nin spektrofotometrik olarak tayin edilmesi, polioksietilen 10 lauril eter ve amonyum molibdattan oluşan ana ayıraç ile oluşturduğu sarı renkli bileşiğin absorbansının 390 nm'de ölçülmesi ile sağlandı (Atkinson vd., 1973).

Pi ölçümünde kullanılan ayıraçlar:

- **5 Polioksietilen 10 Lauril eter:** 5 g Polioksietilen eter tartılarak saf su ile çözüldü ve 100 ml'ye tamamlandı. Kullanılmadan önce oluşan bulanıklığın giderilmesi için 37 °C'de 30-40 dk bekletildi.
- **% 2 Molibdik asit:** 2 g $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ tartılarak, 100 mL 1,8 M H_2SO_4 çözeltisinde çözüldü.
- **Ana ayıraç:** 10 mL % 5 Polioksietilen eter, 25 mL % 2 Molibdik asit ve 65 mL saf su karıştırılarak hazırlandı.

Son hacmi 110 μL (60 μL inkübasyon ortamı, 5 μL süpernatant ve 35 μL soğuk saf su) olan mikropate kuyucuklarına 190 μL ana ayıraçtan konarak oda sıcaklığında 10 dk kompleks oluşumu için bekletildi ve daha sonra 390 nm'de

absorbans değerleri ölçüldü. Sonuçlar 100, 250, 500, 750, 1000 µM KH₂PO₄ çözeltisinden hazırlanarak elde edilen standart eğri üzerinden değerlendirildi (Şekil 3.22.).



Şekil 3.1. Fosfat derişimi ile absorbans arasındaki doğrusal ilişkiyi gösteren inorganik fosfat (Pi) standart eğrisi.

3.7.4. ATPaz Aktivitesinin Hesaplanması

$$\text{ATPaz aktivitesi} = \frac{\text{OD}/0.0011^* \times 0.3 \text{ mL}}{1000 \times 0.005 \text{ mL} \times 30 \text{ dk.} \times \text{mg prot./mL}} \times 10^{**}$$

* = İnorganik fosfat regresyon eşitliği ($y = 0.0011x$)

**= Sulandırım katsayısı

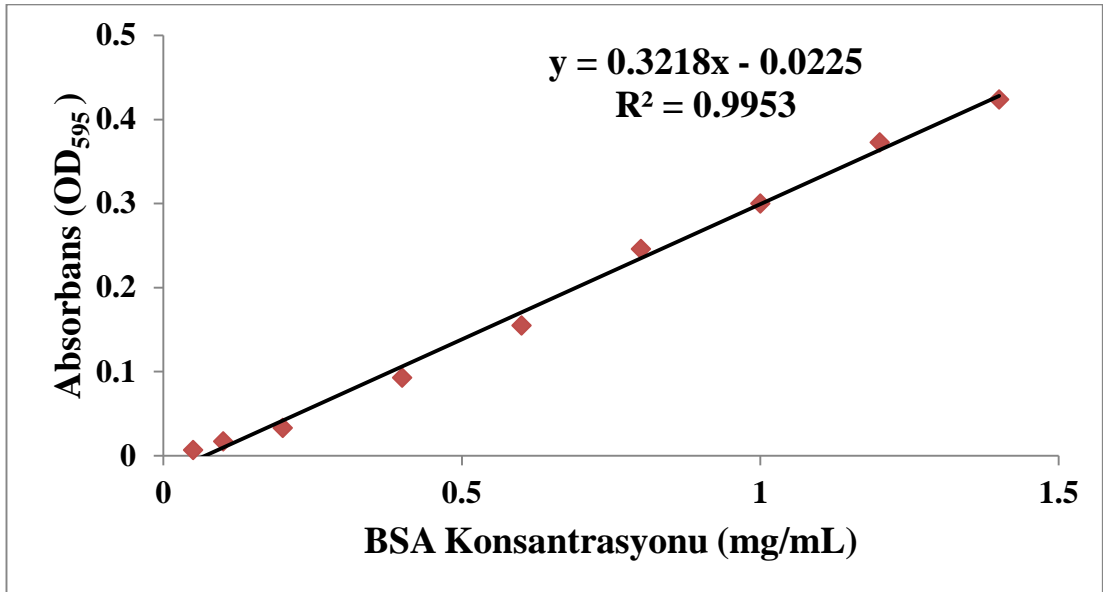
0.09 mg Al/L TFS'ne 96 saat maruz kalan *X. laevis* iribaşlarında Mg⁺²-ATPaz aktivitesi:

$$\text{Mg}^{+2}\text{ATPaz akt.} = \frac{0.457/0.0011^* \times 0.3 \text{ mL}}{1000 \times 0.005 \text{ mL} \times 30 \text{ dk.} \times 3.1 \text{ mg prot./mL}} \times 10$$

Mg⁺²ATPaz akt. = 160.8 µmol Pi/mg prot./sa olarak bulunmuştur.

3.8. Toplam Protein Miktarı Tayini

İribaş homojenatlarında toplam protein miktarları Bradford (1976) tarafından geliştirilen yöntemle göre, mikropilaka okuyucu sisteme uyarlanarak tespit edildi. Süpernatant örnekleri 1/4 oranında sulandırıldıktan sonra, sulandırılmış örneklerden 5 µL mikropilaka kuyucuklarına pipetlendi ve üzerine 250 µL Bradford çözeltisi (Sigma B6916, USA) eklendi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında karanlıkta 15 dakika süreyle inkübe edildi. Renk değişimine bağlı olarak, 595 nm dalga boyunda absorbans değeri ölçüldü. Örneklerdeki toplam protein değerleri bir bilgisayar paket programı (Slide) kullanılarak, elde edilen değerler ile BSA (Bovine Serum Albumin) standart eğrisi değerleri karşılaştırılarak hesaplandı (Şekil 3.2.). Daha sonra sulandırma faktörü göz önünde bulundurularak süpernatantlardaki toplam protein değerleri hesaplandı. Elde edilen toplam protein değerleri, spektrofotometrik okuma değerlerine göre hesaplanan S16 fraksiyonları enzim aktivitesi değerleri kullanılarak, spesifik aktivite değerlerinin hesaplanmasında kullanıldı.



Şekil 3.2. BSA standart eğrisi.

3.9. İstatistiksel Analiz ve Hesaplamalar

Bulguların istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla istatistik paket programları kullanıldı. İribaşlarda enzimatik analiz sonucunda elde edilen bulguların analizi için SPSS 15.0 programı (SPSS Inc., USA), LC₅₀ (ortalama öldürücü

konsantrasyon) değerlerinin saptanması için EPA tarafından geliştirilen Finney'in probit analizi paket programı kullanıldı. Ölüm oranlarının ve enzim aktivitelerinin uygulama gruplarına bağlı olarak test edilmesi amacıyla varyans analizi (One-Way ANOVA) yöntemi uygulandı. Gruplar arası farklılık düzeyi en az %95 olasılık ile ($p<0.05$ için) önemli olarak değerlendirildi. Buna bağlı olarak, gruplar arası farklılığın önemli olup olmadığı $p<0.05$ düzeyinde önem seviyesine göre saptandı. Gruplar arası farklılığın önemli olduğu saptandığında enzim aktiviteleri için örnekler ikili karşılaştırma ile non-parametrik Mann-Whitney U testine göre kontrol grubu verileri ile karşılaştırıldı. NOAEC değerlerinin hesaplanmasında ve ölüm oranları için örneklerin ikili karşılaştırılmasında Dunnett-t testi kullanıldı. Grup içi farklılığın $p<0.05$ düzeyinde önemli bulunduğu gruplar saptandı.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Tez çalışmasında iki farklı uygulama sresinde pestisit toksitesini ve etkilerini belirlemek üzere tüm aşamalarda iki farklı uygulama grubu kuruldu. Öncelikle 50-58. evredeki *Xenopus laevis* iribaşları pestisit ve pestisit karışımlarının belirlenen bütün konsantrasyonlarına 96 saat statik yenilemeli test düzeneğinde maruz bırakıldı. Buna bağlı olarak seçilen pestisit ve pestisit karışımlarının ortalama öldürücü konsantrasyon (LC_{50}) değerleri belirlendi.

Çalışmanın ikinci aşamasında ise 50-58. evredeki *X. laevis* iribaşları 96 saatlik uygulama sonuçlarına göre hesaplanan LC_{50} , $LC_{50}/2$, $LC_{50}/10$, $LC_{50}/20$, $LC_{50}/50$ ve $LC_{50}/100$ değerlerine 24 saat süresince maruz bırakılarak, biyobelirteç olarak seçilen enzimlerin düzeylerindeki değişimin saptanması amaçlandı. Uygulama sürecinin hiçbir aşamasında deneylerde kullanılan iribaşlar beslenmedi.

Her bir pestisit ve/veya pestisit karışımı uygulamasında kullanılacak iribaşların istenilen evrelere ulaşabilmesi için gerekli süre yaklaşık 3 aylık bir dönemi kapsamaktadır. Bu süre içerisinde doğal ölümlerden kaynaklanan eksilmeleri ortadan kaldırmak ve yeterli sayıda iribaş elde etmek için gereksinim duyulan yumurtalar, farklı ergin dişi ve erkek kurbağalardan sağlandı. Bundan dolayı 96 ve 24 saatlik uygulamalar farklı zamanlarda kuruldu ve ayrı kontrol grupları oluşturuldu. Bütün istatistiksel değerlendirmeler uygulamaların kendilerine ait kontrol grupları ile karışılaştırılmasına göre yapıldı. Farklı ebeveynlerden elde edilen iribaşların pestisit toksisitesine verdiği yanıtlar karışılaştırılarak, deneyler arasında fark olup olmadığı analiz edildi ve farklı deneyler arasında bir paralellik olduğu saptandı.

Çalışmada, bulgular değerlendirilirken 24 ve 96 saatlik iki ayrı grup olarak incelendi.

4.1. 96 Saatlik Çalışmalar İle İlgili Bulgular

4.1.1. 96 Saatlik LC₅₀ ve NOAEC Değerleri

Çalışmada kullanılan trifloksistrobin ve thiaklopridin LC₅₀ değerlerinin belirlenmesi amacıyla, yapılan ön çalışma verileri göz önünde bulundurularak, seçilen konsantrasyonlarda her bir pestisit/pestisit karışımı etkisine maruz bırakılan 50-58. evredeki iribaşlar için 96 saatlik LC₅₀ ve NOAEC değerleri hesaplandı. Bu çalışmalar sonucu elde edilen değerler Çizelge 4.1.'de verilmiştir. Bu verilere göre pestisitlerin 96 saatlik LC₅₀ ve NOAEC değerleri bakımından Thiakloprid>Trifloksistrobin şeklinde bir ilişki saptanmıştır.

Çalışmamızda seçilen iki pestisit ticari formülasyonları kullanıldığından dolayı, deneyde kullanılan LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/10, LC₅₀/20, LC₅₀/50 ve LC₅₀/100 konsantrasyonları ile NOAEC değerleri, pestisitlere ait ticari paketlerin üzerindeki % ya da litredeki aktif etken madde miktarına göre hesaplanmıştır.

Çizelge 4.1. Pestisitlerin 96 saatlik LC₅₀ ve NOAEC değerleri.

Pestisit	LC ₅₀ (mg AI/L)	NOAEC (mg AI/L)
Thiakloprid	13.41	12.75
Trifloksistrobin	0.09	0.08

NOAEC; Ölüm etkisinin görülmediği en yüksek konsantrasyon.

4.1.2. 96 Saatlik Uygulamalarda Ortamların pH Değerleri

Organizmaların pestisitlere maruz kalacakları ortamda, 24 saatlik periyotlarda bir pH değişiminin olup olmadığının saptanması önemlidir. Çünkü kaplardaki pestisit çözeltileri 24 saatlik aralıklarla yenilediğinden, ortamın pH değişimi toksisiteyi etkileyen bir faktör olabilir. Bundan dolayı çalışmada kullanılan pestisit çözeltilerinin pH değerleri, 0., 24., 48., 72. ve 96. saatlerde ölü iribaşlar ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra kaplardaki çözeltiler yenilenmeden önce ölçülerek kaydedildi. 96 saat sonundaki ortalama pH değerleri Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir. Çözelti pH'larının 96 saat sonundaki ortalama değerlerine göre, pestisit ve karışımlarının pH değerlerinde toksisiteyi etkileyecek düzeyde değişim belirlenmemiştir.

Çalışmamızda toksisiteyi etkileyebilecek çevresel faktörlerden biri de ortam sıcaklığı olabilir. Ancak tüm çalışmalarda ortam 23 °C ($\pm 1^\circ\text{C}$) sıcaklıkta sabit tutulduğundan, sıcaklığın toksisite üzerine etkisi dikkate alınmamıştır.

Çizelge 4.2. 96 saatlik çalışmalarda elde edilen ortalama pH değerleri.

Konsantrasyon (mg AI/L)	THI	TFS	THI+TFS
Kontrol	7.540	7.540	7.540
LC₅₀/100	7.626	7.701	7.658
LC₅₀/50	7.606	7.702	7.622
LC₅₀/20	7.586	7.692	7.589
LC₅₀/10	7.557	7.675	7.551
LC₅₀/2	7.505	7.668	7.417
LC₅₀	7.406	7.645	6.986

LC₅₀/100 : THI için 0.1341 mgAI/L, TFS için 0.0009 mg AI/L
LC₅₀/50 : THI için 0.2682 mgAI/L, TFS için 0.0018 mg AI/L
LC₅₀/20 : THI için 0.6706 mgAI/L, TFS için 0.0045 mg AI/L
LC₅₀/10 : THI için 1.3412 mgAI/L, TFS için 0.009 mg AI/L
LC₅₀/2 : THI için 6.706 mgAI/L, TFS için 0.045 mg AI/L
LC₅₀ : THI için 13.41 mgAI/L, TFS için 0.09 mg AI/L

4.1.3. 96 Saatlik Çalışmalarda Belirlenen Ölüm Oranları

Pestisit ve pestisit karışımlarının etkisine 96 saat süresince maruz bırakılan 50-58. evredeki iribaşlarda meydana gelen ölümler test süresince kaydedildi. 96 saat sonundaki ölüm değerleri Çizelge 4.3.'de gösterilmiştir. Enzim aktivitesi tayini amacıyla yürütülen çalışmalarda pestisitlerden THI ve THI+TFS karışımlarının özellikle LC₅₀ değerlerinde görülen ölümler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$).

Çizelge 4.3. 96 saatlik çalışmalarda belirlenen ölüm oranları.

Doz	n	THI		TFS		THI + TFS	
		Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)	Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	28	0	0	0	0	0	0
LC ₅₀ /100	21	0	0	0	0	0	0
LC ₅₀ /50	21	0	0	0	0	0	0
LC ₅₀ /20	21	0	0	0	0	0	0
LC ₅₀ /10	21	0	0	0	0	0	0
LC ₅₀ /2	21	1	5	0	0	1	5
LC ₅₀	21	3	14.3*	0	0	21	100*

*: $p < 0.05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

4.1.4. 96 Saatlik Trifloksistrobin Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Trifloksistrobinin belirlenen konsantrasyonlarına 96 saat süreyle maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında, doku hasarının belirlenmesi amacıyla kullanılan ALT, AST ve LDH enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler, Çizelge 4.4.' de verilmiştir.

ALT aktivitesinde, trifloksistrobin konsantrasyonlarına maruz kalan iribaşlarda, konsantrasyonla ilişkili olmayan değişimler belirlendi. En yüksek ALT aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %23 oranında artış ile 56.2 ± 0.35 nmol/dk/mg protein olarak 0.0045 mg AI/L TFS'de (LC₅₀/20 değeri) olduğu saptandı ve bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Aynı şekilde, en düşük doz olan 0.0009 mg AI/L (LC₅₀/100 değeri) ve diğer ara dozlar olan 0.0018 mg AI/L (LC₅₀/50 değeri), 0.009 mg AI/L (LC₅₀/10 değeri), 0.045 mg AI/L (LC₅₀/2 değeri) konsantrasyonlarında arttığı ve ALT aktivitesinin 0.090 mg AI/L (LC₅₀ değeri) TFS dozu dışında, bu artışların da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p < 0.05$).

AST aktivitesinin, bütün TFS konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre düştüğü gözlemlendi. Buna göre, en düşük AST aktivitesi, kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak %12 oranında azalış ile 135.2 ± 7.75 nmol/dk/mg protein olarak 0.090 mg AI/L TFS'de (LC₅₀ değeri) saptandı ve bu azalış kontrol grubu ile

karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$). Aynı şekilde, AST aktivitesinin en düşük doz olan 0.0009 mg AI/L ($LC_{50}/100$ değeri) ve diğer ara dozlar olan 0.0018 mg AI/L ($LC_{50}/50$ değeri), 0.0045 mg AI/L ($LC_{50}/20$ değeri), 0.009 mg AI/L ($LC_{50}/10$ değeri), 0.045 mg AI/L ($LC_{50}/2$ değeri) konsantrasyonlarında da düşüş gösterdiği ve bu düşüşlerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p<0.05$).

LDH aktivitesinde TFS konsantrasyonları ile ilişkisi olmayan değişimler belirlenmesine rağmen, bütün TFS konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre artış gözlemlendi. En yüksek LDH aktivitesi, kontrol grubuna göre %36 artışla 500.43 ± 4.32 nmol/dk/mg protein olarak 0.009 mg AI/L TFS’de ($LC_{50}/10$ değeri) gözlemlendi. Diğer ara dozlar olan 0.0009 mg AI/L ($LC_{50}/100$ değeri), 0.0018 mg AI/L ($LC_{50}/50$ değeri), 0.0045 mg AI/L ($LC_{50}/20$ değeri), 0.045 mg AI/L ($LC_{50}/2$ değeri) ve 0.09 mg AI/L (LC_{50} değeri) konsantrasyonlarında da artış gösterdiği ve bu artışların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p<0.05$).

Çizelge 4.4. 96 saatlik TFS uygulamasının ALT, AST ve LDH enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

TRİFLOKSİSTROBİN				
Konsantrasyon (mg AI/L)	n	ALT	AST	LDH
KONTROL	4	45.75 \pm 2.03	152.9 \pm 0.82	368.3 \pm 15.56
<i>LC₅₀/100</i>	3	52.9 \pm 0.35*	136.8 \pm 2.08*	444.47 \pm 5.18*
<i>LC₅₀/50</i>	3	53.2 \pm 0.9 *	137.83 \pm 2.50*	463.17 \pm 0.96*
<i>LC₅₀/20</i>	3	56.2 \pm 0.35*	145.53 \pm 1.22*	499.97 \pm 4.89*
<i>LC₅₀/10</i>	3	55.47 \pm 1.58*	147.63 \pm 1.60*	500.43 \pm 4.32*
<i>LC₅₀/2</i>	3	50.67 \pm 0.15*	138.37 \pm 0.48*	426.33 \pm 2.69*
<i>LC₅₀</i>	3	51.47 \pm 4.00	135.2 \pm 7.75*	431.67 \pm 15.04*

*: $p<0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

96 saat süreyle TFS’nin belirlenen konsantrasyonlarına maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında detoksifikasyondan sorumlu olan GST, CaE ve nörotoksik etkilerin ortaya koyulması amacıyla biyobelirteç olarak kullanılan AChE enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.5.’ de verilmiştir.

GST aktivitesinde, kontrol grubuna göre bütün TFS konsantrasyonlarında uygulanan konsantrasyonlarla ilişkili olmayan artış gözlemlendi. En yüksek GST aktivitesi, kontrol grubuna göre % 43 artışla 183.23 ± 8.83 nmol/dk/mg protein olarak 0.0018 mg AI/L TFS’de ($LC_{50/50}$ değeri) saptandı. Bu değişimlerin, bütün TFS konsantrasyonlarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p < 0.05$).

CaE aktivitesinde, uygulanan bütün TFS konsantrasyonlarında konsantrasyonla ilişkili olmayan inhibisyon görüldü. En düşük CaE aktivitesi, kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak % 23 oranında azalış ile 311.43 ± 2.53 nmol/dk/mg protein olarak 0.045 mg AI/L TFS’de ($LC_{50/2}$ değeri) saptandı. Bu değişimlerin bütün TFS konsantrasyonlarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p < 0.05$).

AChE aktivitesinde, TFS konsantrasyonlarıyla doğrusal olmayan inhibisyonlar belirlendi. Kontrol grubuna göre, % 37’lik bir inhibisyonla en düşük AChE aktivitesi, en yüksek konsantrasyon olan 0.09 mg AI/L TFS’de (LC_{50} değeri) 42.93 ± 0.93 nmol/dk/mg protein olarak ölçüldü ve bu inhibisyon kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Aynı şekilde, diğer bütün TFS konsantrasyonlarında meydana gelen AChE aktivite düşüşleri kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$).

Çizelge 4.5. 96 saatlik TFS uygulamasının GST, CaE ve AChE enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

TRİFLOKSİSTROBİN				
Konsantrasyon (mg AI/L)	n	GST	CaE	AChE
KONTROL	4	127.85 ± 4.95	405.1 ± 8.08	68.3 ± 0.77
<i>LC_{50/100}</i>	3	$166.7 \pm 11.52^*$	$344.9 \pm 5.90^*$	$46.5 \pm 0.35^*$
<i>LC_{50/50}</i>	3	$183.23 \pm 8.83^*$	$343.1 \pm 7.07^*$	$52.3 \pm 1.00^*$
<i>LC_{50/20}</i>	3	$165.00 \pm 10.27^*$	$338.0 \pm 0.25^*$	$52.8 \pm 1.53^*$
<i>LC_{50/10}</i>	3	$181.07 \pm 13.51^*$	$338.03 \pm 3.23^*$	$49.43 \pm 3.09^*$
<i>LC_{50/2}</i>	3	$162.53 \pm 7.44^*$	$311.43 \pm 2.53^*$	$53.13 \pm 1.38^*$
<i>LC₅₀</i>	3	$164.47 \pm 13.02^*$	$355.73 \pm 1.02^*$	$42.93 \pm 0.93^*$

*: $p < 0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

Belirlenen TFS konsantrasyonlarına 96 saat boyunca maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında oksidatif stresin varlığını ve derecesini ortaya koymak için biyobelirteç olarak kullanılan CAT, GR ve GPx antioksidan enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler çizelge 4.6.' da verilmiştir.

GR aktivitesi, TFS'ye maruz kalan iribaşlarda konsantrasyon artışı ile paralel olmayan değişimler belirlenmesine rağmen, bu değişimlerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli olmadığı saptandı ($p>0.05$). En yüksek ve en düşük GR aktivitesi sırasıyla kontrol grubuna göre % 11 oranında artış ile 18.1 ± 0.42 nmol/dk/mg protein olarak 0.009 mg AI/L TFS'de ($LC_{50}/10$ değeri) ve % 5 oranında azalış ile 15.47 ± 0.30 nmol/dk/mg protein olarak 0.045 mg AI/L TFS'de ($LC_{50}/2$ değeri) ölçüldü.

CAT aktivitesinde, TFS konsantrasyonlarıyla ilişkisi olmayan değişimler gözlemlendi. En yüksek ve en düşük CAT aktiviteleri sırasıyla 0.090 mg AI/L (LC_{50} değeri) ve 0.0045 mg AI/L ($LC_{50}/20$ değeri) TFS uygulamasında % 65 indüksiyonla 36.23 ± 0.578 ve % 35 inhibisyonla 14.27 ± 0.393 nmol/dk/mg protein olarak ölçüldü. CAT aktivitesinde, kontrol grubuna kıyasla, 0.0009 mg AI/L ($LC_{50}/100$ değeri) doz grubu hariç, bütün TFS konsantrasyonlarında meydana gelen değişimler istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

GPx aktivitesinde, bütün TFS konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre aktivasyon gözlemlendi. En yüksek GPx aktivitesi, kontrol grubuna göre % 104 artışla 6.60 ± 0.200 nmol/dk/mg protein olarak 0.0018 mg AI/L TFS'de ($LC_{50}/50$ değeri) bulundu ve bütün TFS konsantrasyonlarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gözlenen artışların istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p<0.05$).

Çizelge 4.6. 96 saatlik TFS uygulamasının GR, CAT ve GPx enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

TRİFLOKSİSTROBİN				
Konsantrasyon (mg AI/L)	n	GR	CAT	GPx
KONTROL	4	16.28 \pm 0.68	22.00 \pm 0.135	3.23 \pm 0.132
<i>LC₅₀/100</i>	3	16.77 \pm 0.37	20.08 \pm 0.569	5.50 \pm 0.153*
<i>LC₅₀/50</i>	3	16.8 \pm 0.29	17.03 \pm 0.200*	6.60 \pm 0.200*
<i>LC₅₀/20</i>	3	16.63 \pm 0.64	14.27 \pm 0.393*	6.40 \pm 0.321*
<i>LC₅₀/10</i>	3	18.1 \pm 0.42	24.77 \pm 0.578*	5.57 \pm 0.067*
<i>LC₅₀/2</i>	3	15.47 \pm 0.30	27.73 \pm 0.639*	5.80 \pm 0.115*
<i>LC₅₀</i>	3	16.00 \pm 1.23	36.23 \pm 0.578*	5.57 \pm 0.167*

*: $p < 0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

Seçilen TFS konsantrasyonlarına 96 saatlik maruziyet sonucunda *Xenopus laevis* iribaşlarında osmoregülasyon metabolizması parametreleri olarak kullanılan ATPaz enzim aktivitelerindeki değişimler Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesinde, bütün TFS konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre artış gözlemlendi. En yüksek Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesi, kontrol grubuna göre % 604 oranında artışla 56.66 \pm 2.49 nmol/dk/mg protein olarak 0.0045 mg AI/L TFS'de (LC₅₀/20 değeri) bulundu ve bütün TFS konsantrasyonlarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gözlenen artışların istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p < 0.05$).

Toplam ATPaz aktivitesinde, bütün TFS konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre azalış gözlemlendi. En fazla düşüş, kontrol grubuna göre % 75 azalışla 12.95 \pm 0.94 nmol/dk/mg protein olarak 0.009 mg AI/L TFS'de (LC₅₀/10 değeri) bulundu ve bütün TFS konsantrasyonlarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gözlenen azalışların istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p < 0.05$).

Mg²⁺ ATPaz aktivitesinin, bütün TFS konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre inhibisyona uğradığı ve en düşük Mg²⁺ ATPaz aktivitesinin 0.0009 mg/L AI/L TFS'de (LC₅₀/100 değeri) yaklaşık % 41 oranında inhibisyon ile 167.48 \pm 6.86 nmol/dk/mg protein değerinde olduğu bulundu. Bütün TFS konsantrasyonlarında enzim aktivitesindeki baskılanmalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli bulundu ($p < 0.05$).

Ca²⁺ ATPaz aktivitesinin de toplam ATPaz ve Mg²⁺ ATPaz aktivitelerinde olduğu gibi bütün TFS konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre inhibisyon uğradığı ve en düşük Ca²⁺ ATPaz aktivitesinin yaklaşık % 36 oranında inhibisyon ile 170.58±12.43 nmol/dk/mg protein olarak 0.090 mg AI/L TFS'de (LC₅₀ değeri) olduğu bulundu ve bütün TFS konsantrasyonlarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gözlenen azalışların istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p<0.05$).

Çizelge 4.7. 96 saatlik TFS uygulamasının ATPaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi (µmol/dk/mg protein ± standart hata).

TRİFLOKSİSTROBİN					
Konsantrasyon (mg AI/L)	n	Na ⁺ /K ⁺ ATPaz	Toplam ATPaz	Mg ²⁺ ATPaz	Ca ²⁺ ATPaz
KONTROL	4	8.05 ± 0.31	52.38 ± 2.49	282.66 ± 10.44	265.21 ± 12.84
<i>LC_{50/100}</i>	3	14.09 ± 1.58*	18.79 ± 1.06*	167.48 ± 6.86*	179.70 ± 8.08*
<i>LC_{50/50}</i>	3	26.22 ± 2.89*	21.19 ± 0.86*	187.25 ± 7.45*	188.98 ± 6.74*
<i>LC_{50/20}</i>	3	56.66 ± 2.49*	18.18 ± 1.01*	194.51 ± 4.13*	197.42 ± 8.81*
<i>LC_{50/10}</i>	3	39.78 ± 1.68*	12.95 ± 0.94*	223.27 ± 0.61*	204.16 ± 4.92*
<i>LC_{50/2}</i>	3	28.00 ± 1.11*	25.40 ± 0.81*	183.00 ± 7.59*	177.11 ± 7.54*
<i>LC₅₀</i>	3	15.70 ± 2.23*	23.41 ± 1.24*	182.41 ± 11.13*	170.58 ± 12.43*

*: $p<0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

4.1.5. 96 Saatlik Thiaklopid Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Doku hasarının belirlenmesi amacıyla, 96 saat süreyle Thiaklopidin (THI) belirlenen konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Xenopus laevis* iribaşlarında ALT, AST ve LDH enzim aktivitesinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.8.' de verilmiştir.

ALT aktivitesinde, THI konsantrasyonlarıyla ilişkisi olmayan değişimler belirlendi. En yüksek ve en düşük ALT aktiviteleri sırasıyla 13.41 mg AI/L (LC₅₀ değeri) ve 0.1341 mg AI/L (LC₅₀/100 değeri) THI uygulamasında 58.90±0.42 ve 48.40±1.26 nmol/dk/mg protein olarak ölçüldü. ALT aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla bütün THI konsantrasyonlarında meydana gelen değişimler istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

AST aktivitesinin, bütün THI konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi. Buna göre, en yüksek AST aktiviteleri, sırasıyla kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak % 25 oranında artış ile 181.97±1.56 nmol/dk/mg protein olarak 13.41 mg AI/L THI'da (LC₅₀ değeri) ve % 21 oranında artış ile 176.53±1.48 nmol/dk/mg protein olarak 0.2682 mg AI/L THI'da (LC₅₀/50 değeri) bulundu. Bütün THI konsantrasyonları için AST aktivitesinde meydana gelen artışların kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p<0.05$).

LDH aktivitesinde, THI konsantrasyonlarıyla paralel olmayan artışlar gözlemlendi. En yüksek LDH aktiviteleri, sırasıyla kontrol grubuna göre % 19 artış ile 436.60±1.08 nmol/dk/mg protein olarak 6.706 mg AI/L THI'da (LC₅₀/2 değeri) ve % 15 oranında artış ile 422.60±2.95 nmol/dk/mg protein olarak 13.41 mg AI/L THI'da (LC₅₀ değeri) gözlemlendi. Diğer THI konsantrasyonlarında da LDH aktivitesinde meydana gelen artışlar kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

Çizelge 4.8. 96 saatlik THI uygulamasının ALT, AST ve LDH enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

THIAKLOPRİD				
Konsantrasyon (mg AI/L)	n	ALT	AST	LDH
KONTROL	4	51.00 \pm 0.56	146.08 \pm 0.78	368.10 \pm 1.93
<i>LC_{50/100}</i>	3	48.40 \pm 1.26*	157.33 \pm 1.18*	386.03 \pm 1.92*
<i>LC_{50/50}</i>	3	57.77 \pm 1.09*	176.53 \pm 1.48*	410.73 \pm 1.83*
<i>LC_{50/20}</i>	3	49.10 \pm 0.50*	152.87 \pm 0.95*	386.23 \pm 0.55*
<i>LC_{50/10}</i>	3	48.77 \pm 0.33*	154.50 \pm 1.55*	384.80 \pm 2.02*
<i>LC_{50/2}</i>	3	58.30 \pm 1.10*	170.20 \pm 1.48*	436.60 \pm 1.08*
<i>LC₅₀</i>	3	58.90 \pm 0.42*	181.97 \pm 1.56*	422.60 \pm 2.95*

*: $p < 0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

96 saat boyunca seçilen THI konsantrasyonlarına maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında detoksifikasyon ve nörotoksisite belirteçleri olan GST, CaE ve AChE enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.9.'da verilmiştir.

GST aktivitesinde, 6.706 mg AI/L (*LC_{50/2}* değeri) THI konsantrasyonuna kadar olan gruplarda konsantrasyonla ilişkili olmayan inhibisyon görülürken, en yüksek THI konsantrasyonunda ise artış gözlemlendi. Bu değişimlerin 6.706 mg AI/L (*LC_{50/2}* değeri) dışındaki bütün THI konsantrasyonlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p < 0.05$).

CaE aktivitesinde, bütün THI konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre konsantrasyonla ilintili olmayan inhibisyon gözlemlendi. En düşük CaE aktivitesi, kontrol grubuna göre % 21 azalışla 336.20 \pm 2.81 nmol/dk/mg protein olarak 0.1341 mg AI/L thiaklopridde (*LC_{50/100}* değeri) gözlemlendi. CaE aktivitesinde kontrol grubuna kıyasla bütün thiakloprid konsantrasyonlarında meydana gelen düşüşler istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$).

THI konsantrasyonlarıyla ilişkisi olmayan değişimler, AChE aktivitesinde belirlendi. En yüksek ve en düşük AChE aktiviteleri sırasıyla 0.2682 mg AI/L (*LC_{50/50}* değeri) ve 1.341 mg AI/L (*LC_{50/10}* değeri) THI uygulamasında 78.63 \pm 0.17 ve 67.00 \pm 0.50 nmol/dk/mg protein olarak ölçüldü ve bu değişimler kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Aynı şekilde, AChE aktivitesinin

13.41 mg/L (LC_{50} değeri) ve 6.706 mg/L ($LC_{50}/2$ değeri) konsantrasyonlarında arttığı ve bu artışların da kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p<0.05$).

Çizelge 4.9. 96 saatlik THI uygulamasının GST, CaE ve AChE enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

THIAKLOPRİD				
Konsantrasyon (mg AI/L)	n	GST	CaE	AChE
KONTROL	4	124.60 \pm 3.87	424.95 \pm 4.38	69.03 \pm 0.31
<i>LC₅₀/100</i>	3	96.97 \pm 1.24*	336.20 \pm 2.81*	68.57 \pm 0.12
<i>LC₅₀/50</i>	3	105.93 \pm 2.62*	392.83 \pm 3.14*	78.63 \pm 0.17*
<i>LC₅₀/20</i>	3	106.97 \pm 2.63*	362.93 \pm 1.96*	68.13 \pm 0.38
<i>LC₅₀/10</i>	3	114.77 \pm 0.81*	353.37 \pm 1.76*	67.00 \pm 0.50*
<i>LC₅₀/2</i>	3	130.23 \pm 3.00	365.67 \pm 1.54*	76.50 \pm 0.44*
<i>LC₅₀</i>	3	145.33 \pm 4.83*	379.73 \pm 0.88*	73.27 \pm 0.61*

*: $p<0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

Oksidatif stres varlığını ve derecesini ortaya koymak için 96 saat süresince belirlenen THI konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Xenopus laevis* iribaşlarında GR, CAT ve GPx aktivitelerindeki değişim Çizelge 4.10.'da verilmiştir.

THI konsantrasyonları ile paralel olmayan azalış ve artışların görüldüğü GR aktivitesinde, en yüksek ve en düşük GR aktiviteleri sırasıyla 0.2682 mg AI/L ($LC_{50}/50$ değeri) ve 0.1341 mg AI/L ($LC_{50}/100$ değeri) THI'da 18.97 ± 0.22 ve 16.17 ± 0.48 nmol/dk/mg protein olarak ölçüldü ve kontrol grubuyla kıyaslandığında en yüksek aktivite istatistiksel olarak önemli bulunurken ($p<0.05$), en düşük aktivitenin istatistiksel anlamda önemsiz olduğu saptandı ($p>0.05$). 1.341 mg/L ($LC_{50}/10$) THI'ya maruz kalan iribaşlarda enzim aktivitesi değerleri kontrol grubuna benzer bir eğilim sergiledi. Ayrıca, GR aktivitesinin en yüksek THI konsantrasyonları olan 13.41 mg/L (LC_{50} değeri) ve 6.706 mg/L'de ($LC_{50}/2$ değeri) konsantrasyonla ilintili arttığı gözlemlendi ve bu artışların kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli düzeyde olduğu bulundu ($p<0.05$).

CAT aktivitesinde, 0.1341 mg AI/L (LC₅₀/100) ve 0.2682 mg AI/L (LC₅₀/50 değeri) THI doz gruplarına maruz kalan iribaşlarda enzim aktivite değerleri kontrol grubuna benzer bir eğilim sergilerken, diğer bütün THI uygulama konsantrasyonlarında, konsantrasyonla ilişkili olmayan inhibisyon gözlemlendi. En düşük CAT aktiviteleri sırasıyla % 31 oranında inhibisyonla 0.6706 mg AI/L (LC₅₀/20 değeri) THI'da 15.17±0.273 nmol/dk/mg protein olarak ve % 28 oranında inhibisyonla 13.41 mg AI/L (LC₅₀ değeri) THI'da 15.87±0.145 olarak ölçüldü. CAT aktivitesinde, kontrol grubuna kıyasla, 0.1341 mg AI/L (LC₅₀/100 değeri) ve 0.2682 mg AI/L (LC₅₀/50 değeri) doz grupları hariç, diğer THI konsantrasyonlarında meydana gelen değişimler istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

GPx aktivitesinde, bütün THI konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre konsantrasyonla doğrusal olmayan artış gözlemlendi. En yüksek GPx aktivitesi, kontrol grubuna göre % 128 oranında artışla 7.37±0.219 nmol/dk/mg protein olarak 13.41 mg AI/L THI'da (LC₅₀ değeri) görüldü. Bütün THI konsantrasyonlarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gözlenen artışların istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p<0.05$).

Çizelge 4.10. 96 saatlik THI uygulamasının GR, CAT ve GPx enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein ± standart hata).

THIAKLOPRİD				
Konsantrasyon (mg AI/L)	n	GR	CAT	GPx
KONTROL	4	16.25 ± 0.29	22.00 ± 0.135	3.23 ± 0.132
LC₅₀/100	3	16.17 ± 0.48	22.40 ± 0.473	5.50 ± 0.231*
LC₅₀/50	3	18.97 ± 0.22*	21.40 ± 0.451	6.43 ± 0.088*
LC₅₀/20	3	17.50 ± 0.25*	15.17 ± 0.273*	6.57 ± 0.176*
LC₅₀/10	3	16.20 ± 0.12	17.07 ± 0.882*	5.80 ± 0.306*
LC₅₀/2	3	17.83 ± 0.45*	17.20 ± 0.115*	6.50 ± 0.289*
LC₅₀	3	18.40 ± 0.10*	15.87 ± 0.145*	7.37± 0.219*

*: $p<0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

Osmoregülasyon metabolizmasındaki toksisitenin belirlenmesi amacıyla parametre olarak kullanılan ATPaz enzim aktivitelerinin, seçilen THI konsantrasyonlarına 96 saat boyunca maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarındaki değişimleri çizelge 4.11.'de verilmiştir.

Belirlenen THI konsantrasyonlarına maruz kalan iribaşlarda, Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesinin kontrol grubuna göre dozla ilişkili olmayan bir şekilde arttığı belirlendi. En yüksek Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesi, kontrol grubuna göre % 421 düzeyinde artış ile 41.93±0.21 nmol/dk/mg protein olarak 0.6706 mg AI/L THI'da (LC₅₀/20 değeri) bulundu ve bütün THI konsantrasyonlarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gözlenen aktivasyonların istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p<0.05$).

Toplam ATPaz aktivitesinin, bütün THI konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre inhibisyona uğradığı ve bu inhibisyonların dozla ilintili olmadığı gözlemlendi. En fazla düşüş, kontrol grubuna göre yaklaşık % 64 azalış ile 18.78±0.59 nmol/dk/mg protein olarak 13.412 mg AI/L THI'da (LC₅₀ değeri) bulundu ve bütün THI konsantrasyonlarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gözlenen inhibisyonların istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p<0.05$).

Mg⁺² ATPaz aktivitesinin, bütün THI konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre inhibisyona uğradığı ve en düşük Mg⁺² ATPaz aktivitesinin 13.41 mg/L AI/L THI'de (LC₅₀ değeri) yaklaşık % 29 oranında inhibisyon ile 201.49±8.53 nmol/dk/mg protein değerinde olduğu bulundu. Enzim aktivitesindeki dozla paralellik göstermeyen bu baskılanmalar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bütün konsantrasyonlar için istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

Ca⁺² ATPaz aktivitesinin de bütün THI konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre inhibisyona uğradığı ve en düşük Ca⁺² ATPaz aktivitesinin yaklaşık % 29 oranında inhibisyon ile 188.00±6.09 nmol/dk/mg protein olarak 0.1341 mg AI/L THI'da (LC₅₀/100 değeri) olduğu bulundu ve dozla ilintili olmamakla birlikte bütün THI konsantrasyonlarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gözlenen düşüşlerin istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p<0.05$).

Çizelge 4.11. 96 saatlik THI uygulamasının ATPaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi ($\mu\text{mol/dk/mg}$ protein \pm standart hata).

THIAKLOPRİD					
Konsantrasyon (mg AI/L)	n	Na⁺/K⁺ ATPaz	Toplam ATPaz	Mg⁺² ATPaz	Ca⁺² ATPaz
<i>KONTROL</i>	4	8.05 \pm 0.31	52.31 \pm 2.47	282.66 \pm 10.44	265.21 \pm 12.84
<i>LC_{50/100}</i>	3	22.82 \pm 0.21*	27.72 \pm 2.57*	209.04 \pm 2.60*	188.00 \pm 6.09*
<i>LC_{50/50}</i>	3	19.41 \pm 0.94*	37.07 \pm 1.08*	241.42 \pm 3.00*	225.53 \pm 1.55*
<i>LC_{50/20}</i>	3	41.93 \pm 0.21*	28.57 \pm 0.39*	215.19 \pm 2.56*	191.15 \pm 3.34*
<i>LC_{50/10}</i>	3	21.16 \pm 0.81*	34.26 \pm 1.61*	224.95 \pm 5.72*	209.47 \pm 6.63*
<i>LC_{50/2}</i>	3	10.73 \pm 0.11*	24.26 \pm 2.07*	211.12 \pm 3.32*	199.36 \pm 4.06*
<i>LC₅₀</i>	3	34.52 \pm 0.95*	18.78 \pm 0.59*	201.49 \pm 8.53*	211.25 \pm 7.57*

*: $p < 0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

4.1.6. 96 Saatlik Trifloksistrobin+Thiakloprid Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Trifloksistrobin ve Thiakloprid uygulamasının LC₅₀ değerlerinin 1:1 oranındaki karışımları bütün iribaşları 24 saat içerisinde öldürdüğü için, bu konsantrasyonlarda pestisit karışımına maruz kalan iribaş örneklerinde enzim aktiviteleri tayin edilemedi.

Xenopus laevis iribaşlarının 96 saat süreyle belirlenen LC₅₀ konsantrasyonları dışındaki TFS ve THI'nın diğer uygulama dozlarının 1:1 oranındaki karışımlarına maruz kalmaları sonucu oluşabilecek doku hasarlarını ortaya koymak için biyobelirteç olarak kullanılan ALT, AST ve LDH aktivitelerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.12.'de verilmiştir.

LC₅₀ uygulaması dışındaki diğer uygulama konsantrasyonlarında ALT aktivitesinde, bütün TFS+THI karışımı için kontrol grubuna göre dozla ilişkili olmayan artış gözlemlendi. En yüksek ALT aktivitesi, kontrol grubuna göre yaklaşık % 36 artış ile 65.70±3.30 nmol/dk/mg protein olarak 6.706 mg AI/L THI+0.045 mg AI/L TFS'de (LC₅₀/2 değeri) gözlemlendi. Kontrol grubuna göre bütün doz gruplarındaki artışların istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p<0.05$).

AST aktivitesinde, bütün TFS+THI konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre artış gözlemlendi. Bu artışların dozla paralellik göstermediği de belirlendi. En yüksek AST aktivitesi, kontrol grubuna göre % 37 artışla 205.30±6.17 nmol/dk/mg protein olarak 0.1341 mg AI/L THI+0.0009 mg AI/L TFS'de (LC₅₀/100 değeri) gözlemlendi. TFS+THI karışımının bütün doz gruplarında neden olduğu artışlar, kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

LDH aktivitesinde de ALT ve AST'de olduğu gibi bütün TFS+THI konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre dozla ters ilişkili artış gözlemlendi. En yüksek LDH aktivitesi, kontrol grubuna göre % 59 artışla 588.73±3.24 nmol/dk/mg protein olarak en düşük doz grubunda 0.1341 mg AI/L THI+0.0009 mg AI/L TFS'de (LC₅₀/100 değeri) gözlemlendi. TFS+THI karışım uygulamasının bütün doz gruplarındaki artışların, kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır ($p<0.05$).

Çizelge 4.12. 96 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının ALT, AST ve LDH enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

TFS + THI KARIŞIM UYGULAMASI				
Konsantrasyon (mg AI/L)	n	ALT	AST	LDH
KONTROL	4	48.48 \pm 2.89	149.98 \pm 2.27	370.25 \pm 13.61
<i>LC50/100</i>	3	61.23 \pm 2.81*	205.30 \pm 6.17*	588.73 \pm 3.24*
<i>LC50/50</i>	3	61.67 \pm 2.28*	199.87 \pm 4.05*	577.27 \pm 3.54*
<i>LC50/20</i>	3	61.03 \pm 1.45*	193.33 \pm 0.69*	535.17 \pm 11.15*
<i>LC50/10</i>	3	59.73 \pm 1.71*	186.67 \pm 2.41*	533.60 \pm 2.05*
<i>LC50/2</i>	3	65.70 \pm 3.30*	192.50 \pm 6.29*	529.83 \pm 3.16*
<i>LC50</i>	3	N/A	N/A	N/A

*: $p < 0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

N/A: LC₅₀ dozundaki karışım % 100 ölüme yol açtığından çalışılmadı.

Seçilen TFS+THI kombinasyonunun bütün konsantrasyonlarına 96 saat boyunca maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında GST, CaE ve AChE (detoksifikasyon ve nörotoksisite belirteçleri olan) enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.13.'de verilmiştir.

GST aktivitesinde, bütün TFS+THI karışımına maruz kalan iribaşlarda enzim aktivitesinin konsantrasyon artışı ile paralel olmayan bir artış sergilediği belirlendi. TFS+THI karışımının bütün doz gruplarındaki artışlar, kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). En yüksek GST aktivitesi, kontrol grubuna göre % 64 artışla 210.43 \pm 9.99 nmol/dk/mg protein olarak 6.706 mg AI/L THI+0.045 mg AI/L TFS'de (LC₅₀/2 değeri) gözlemlendi.

CaE aktivitesinin TFS+THI karışımına maruz kalan bireylerde, iribaşların pestisit karışımlarına maruz kaldıkları konsantrasyon artışı ile lineer bir ilişki göstermeyen inhibisyona uğradığı bulundu. ($p < 0.05$). CaE aktivitesi, 1.341 mg AI/L THI+0.009 mg AI/L TFS (LC₅₀/10 değeri) karışımına maruz kalan organizmalarda kontrol grubuna oranla yaklaşık olarak % 22 düzeyinde inhibe olduğu ve ölçülen 312.77 \pm 5.35 nmol/dk/mg protein değerinin en düşük aktivite değeri olduğu saptandı. Bu uygulama ile enzim aktivitesinde ortaya çıkan inhibisyon kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). Benzer şekilde

kontrol grubuyla kıyaslandığında, TFS+THI karışımına ait diğer doz gruplarındaki inhibisyonlar da istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

TFS+THI karışımına maruz kalmanın bir sonucu olarak, AChE aktivitesinde, kontrol grubuna göre doz ile ilişkili olmayan bir artış gözlemlendi ve en yüksek AChE aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla yaklaşık % 15 düzeyinde artış ile 0.1341 mg AI/L THI+0.0009 mg AI/L TFS (LC₅₀/100 değeri) karışımına maruz kalan iribaşlarda ortaya çıktığı saptandı. Bu inhibisyon düzeyi kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli bulundu ($p<0.05$). TFS+THI karışım uygulamasının diğer doz gruplarındaki artışlar da kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

Çizelge 4.13. 96 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının GST, CaE ve AChE enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

TFS + THI KARIŞIM UYGULAMASI				
Konsantrasyon (mg AI/L)	n	GST	CaE	AChE
KONTROL	4	128.13 \pm 5.19	402.75 \pm 8.58	68.30 \pm 0.77
LC50/100	3	178.2 \pm 1.95*	331.93 \pm 5.63*	78.80 \pm 2.44*
LC50/50	3	152 \pm 0.76*	326.43 \pm 9.77*	77.20 \pm 0.93*
LC50/20	3	153.8 \pm 3.9*	329.73 \pm 2.48*	77.03 \pm 3.14*
LC50/10	3	168.67 \pm 8.67*	312.77 \pm 5.35*	76.23 \pm 2.47*
LC50/2	3	210.43 \pm 9.99*	343.23 \pm 2.62*	75.73 \pm 2.50*
LC50	3	N/A	N/A	N/A

*: $p<0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

N/A: LC₅₀ dozundaki karışım % 100 ölüme yol açtığından çalışılmadı.

Xenopus laevis iribaşlarında 96 saatlik TFS+THI karışım maruziyeti sonucunda oksidatif stres biyobelirteçleri olan GR, CAT ve GPx enzim aktivitelerindeki değişimler Çizelge 4.14.'de verilmiştir.

GR aktivitesinin, TFS+THI karışımının bütün konsantrasyonlarına maruz kalma sonucunda arttığı ve konsantrasyon artışı ile lineer olmayan bu indüklenmelerin kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.05$). En yüksek GR aktivitesi 0.1341 mg AI/L THI+0.0009 mg AI/L TFS (LC₅₀/100 değeri) karışımına maruz kalan iribaşlarda kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak % 30 artışla 21.13±1.040 nmol/dk/mg protein olarak belirlendi. Bu aktivite artışı kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli bulundu ($p<0.05$).

CAT aktivitesi, 0.1341 mg AI/L THI+0.0009 mg AI/L TFS (LC₅₀/100 değeri) karışımına maruz kalan iribaşlarda enzim aktivite değerleri kontrol grubuna benzer bir eğilim sergiledi. TFS+THI karışım uygulamasının diğer doz gruplarına maruz kalan iribaşlarda ise CAT aktivitesinin konsantrasyonla ilişkili olarak arttığı ve en yüksek CAT aktivitesinin kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak % 61 oranında artış ile 35.40±0.802 nmol/dk/mg protein olarak 6.706 mg AI/L THI +0.045 mg AI/L TFS'de (LC₅₀/2 değeri) olduğu belirlendi ve en düşük karışım dozu LC₅₀/100 hariç diğer bütün gruptaki artış, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

GPx aktivitesinin TFS+THI karışımına maruz kalmanın bir sonucu olarak, 6.706 mg AI/L THI+0.045 mg AI/L TFS (LC₅₀/2 değeri) karışım konsantrasyonuna kadar konsantrasyonla ilişkili olarak artış gösterdiği saptandı ve bu artışlar kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$). En yüksek GPx aktivitesi kontrol grubuna göre yaklaşık % 79 artış ile 5.77±0.219 nmol/dk/mg protein olarak 1.341 mg AI/L THI+0.009 mg AI/L TFS'de (LC₅₀/10 değeri) bulundu. Aynı şekilde, GPx aktivitesinin en yüksek doz olan 6.706 mg AI/L THI+0.045 mg AI/L TFS'de (LC₅₀/2 değeri) de artış gösterdi ve bu artış kontrol grubuna kıyasla istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

Çizelge 4.14. 96 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının GR, CAT ve GPx enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

TFS + THI KARIŞIM UYGULAMASI				
Konsantrasyon (mg AI/L)	n	GR	CAT	GPx
KONTROL	4	16.28 \pm 0.47	22.00 \pm 0.135	3.23 \pm 0.132
LC50/100	3	21.13 \pm 1.040*	22.77 \pm 0.549	4.20 \pm 0.153*
LC50/50	3	20.1 \pm 0.76*	29.60 \pm 0.436*	4.20 \pm 0.289*
LC50/20	3	19.37 \pm 0.12*	31.63 \pm 1.419*	5.70 \pm 0.100*
LC50/10	3	20.27 \pm 0.52*	31.80 \pm 0.650*	5.77 \pm 0.219*
LC50/2	3	20.57 \pm 0.19*	35.40 \pm 0.802*	5.10 \pm 0.265*
LC50	3	N/A	N/A	N/A

*: $p < 0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.
N/A: LC₅₀ dozundaki karışım % 100 ölüme yol açtığından çalışılmadı.

96 saat süreyle belirlenen TFS ve THI konsantrasyonlarının 1:1 oranındaki karışımlarına maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında osmoregülasyon hasarını ortaya koymak için biyobelirteç olarak kullanılan ATPaz enzimlerine ait aktivite değişimleri Çizelge 4.15.'de verilmiştir.

Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesi, bütün TFS+THI karışım konsantrasyonlarına maruz kalan iribaşlarda kontrol grubuna göre konsantrasyon artışı ile paralel olmayan değişimler gösterdi. En yüksek Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesi, kontrol grubuna göre % 344 artışla 6.706 mg AI/L THI+0.045 mg AI/L TFS'de (LC₅₀/2 değeri) 35.71 \pm 0.95 nmol/dk/mg protein olarak bulundu ve bütün TFS+THI konsantrasyonlarında gözlenen artışların, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak önemli olduğu belirlendi ($p < 0.05$).

Bütün TFS+THI konsantrasyonlarına maruz kalan iribaşlarda toplam ATPaz aktivitesinin, kontrol grubuna göre inhibisyona uğradığı gözlemlendi. En fazla düşüş, kontrol grubuna göre % 50 inhibisyonla 26.19 \pm 0.86 nmol/dk/mg protein olarak 6.706 mg AI/L TH+0.045 mg AI/L TFS'de (LC₅₀/2 değeri) bulundu ve bütün TFS+THI konsantrasyonlarında, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gözlenen azalışların istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p < 0.05$).

Mg⁺² ATPaz aktivitesinde 0.2682 mg AI/L THI+0.0018 mg AI/L TFS (LC₅₀/50) dozu hariç bütün TFS+THI konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre genel anlamda dozla ilişkili bir inhibisyon gözlemlendi ve en düşük Mg⁺² ATPaz aktivitesinin 6.706 mg AI/L THI+0.045 mg AI/L TFS’de (LC₅₀/2 değeri) yaklaşık % 33 oranında inhibisyon ile 189.84±1.57 nmol/dk/mg protein değerinde olduğu bulundu. Enzim aktivitesindeki baskılanmalar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

Ca⁺² ATPaz aktivitesinin TFS+THI karışımına maruz kalmanın bir sonucu olarak, 6.706 mg AI/L THI+0.045 mg AI/L TFS (LC₅₀/2 değeri) karışım konsantrasyonuna kadar konsantrasyonla ilişkili olarak inhibisyona uğradığı saptandı ve bu azalışlar kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$). En düşük Ca⁺² ATPaz aktivitesinin yaklaşık % 30 oranında inhibisyon ile 185.91±6.82 nmol/dk/mg protein olarak 1.341 mg AI/L THI+0.009 mg AI/L TFS’de (LC₅₀/10 değeri) olduğu bulundu ve bütün TFS+THI konsantrasyonlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gözlenen düşüşlerin istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p<0.05$).

Çizelge 4.15. 96 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının ATPaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi (µmol/dk/mg protein ± standart hata).

TFS + THI KARIŞIM UYGULAMASI					
Konsantrasyon (mg AI/L)	n	Na ⁺ /K ⁺ ATPaz	Toplam ATPaz	Mg ⁺² ATPaz	Ca ⁺² ATPaz
KONTROL	4	8,05 ± 0.31	52,38 ± 2.49	282,66 ± 10.44	265,21 ± 12.84
LC50/100	3	16,99 ± 1.63*	28,51 ± 1.05*	233,75 ± 6.26*	238,44 ± 2.55*
LC50/50	3	31,79 ± 1.55*	26,91 ± 2.48*	221,78 ± 0.95*	216,62 ± 2.16*
LC50/20	3	21,11 ± 1.69*	36,89 ± 1.68*	222,63 ± 10.46*	207,00 ± 8.10*
LC50/10	3	18,92 ± 1.23*	26,88 ± 0.94*	193,28 ± 6.95*	185,91 ± 6.82*
LC50/2	3	35,71 ± 0.95*	26,19 ± 0.86*	189,84 ± 1.57*	189,80 ± 6.31*
LC50	3	N/A	N/A	N/A	N/A

*: $p<0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.
N/A: LC₅₀ dozundaki karışım % 100 ölüme yol açtığından çalışılmadı.

4.2. 24 Saatlik Çalışmalar İle İlgili Bulgular

4.2.1. 24 Saatlik Uygulamalarda Ortamların pH Değerleri

Çalışmada kullanılan pestisit çözeltilerinin pH değerleri 0. ve 24. saatlerde ölçüldü. 24 saat sonundaki ortalama pH değerleri çizelge 4.16.'da verilmiştir. Çözelti pH'larının 24 saat sonundaki ortalamalarına bakıldığında, pestisit karışımlarının bulunduğu ortamın pH değerlerinde toksisiteyi etkileyecek düzeyde bir değişim belirlenmemiştir.

Çizelge 4.16. 24saatlik çalışmalarda elde edilen ortalama pH değerleri.

Konsantrasyon mg AI/L	THI+TFS
Kontrol	7.512
LC ₅₀ /100	7.477
LC ₅₀ /50	7.455
LC ₅₀ /20	7.394
LC ₅₀ /10	7.305
LC ₅₀ /2	7.141
LC ₅₀	6.971

LC₅₀/100 : THI için 0.1341 mgAI/L, TFS için 0.0009 mg AI/L

LC₅₀/50 : THI için 0.2682 mgAI/L, TFS için 0.0018 mg AI/L

LC₅₀/20 : THI için 0.6706 mgAI/L, TFS için 0.0045 mg AI/L

LC₅₀/10 : THI için 1.3412 mgAI/L, TFS için 0.009 mg AI/L

LC₅₀/2 : THI için 6.706 mgAI/L, TFS için 0.045 mg AI/L

LC₅₀ : THI için 13.41 mgAI/L, TFS için 0.09 mg AI/L

4.2.2. 24 Saatlik Çalışmalarda Belirlenen Ölüm Oranları

Pestisit etkisine 24 saat süresince maruz bırakılan 50-58. evredeki iribaşlarda meydana gelen ölümler deney sonunda kaydedildi. 24 saatlik uygulama için kurulan enzimatik çalışmaya ait ölüm oranları Çizelge 4.17.'de verilmiştir. Çalışmada, LC₅₀/100, LC₅₀/50, LC₅₀/20, LC₅₀/10 ve LC₅₀/2 pestisit karışım uygulama gruplarında öldürücü toksik etki saptanmadı. Kısa süreli akut toksisitenin belirlenebilmesi için TFS+THI karışım konsantrasyonlarına maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşları, 24 saat süreyle izlendi ve LC₅₀ karışım uygulamasında ölmek üzere olan iribaşlar toplandı ve ölen iribaşlar ise kaydedildi. İkili pestisit karışımların LC₅₀ değerlerinde meydana gelen ölümlerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p < 0.05$).

Çizelge 4.17. 24 saatlik çalışmalarda belirlenen ölüm oranları.

Doz (mg AI/L)	n	THI + TFS	
		Toplam Ölüm	Ölüm Oranı (%)
Kontrol	28	0	0
LC ₅₀ /100	21	0	0
LC ₅₀ /50	21	0	0
LC ₅₀ /20	21	0	0
LC ₅₀ /10	21	0	0
LC ₅₀ /2	21	0	0
LC ₅₀	21	7	33*

*: $p < 0.05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

4.2.3. 24 Saatlik Trifloksistrobin+Thiaklopid Uygulamasının Biyobelirteç Enzimler Üzerine Etkisi

Kısa süreli akut toksisite etkilerinin belirlenebilmesi için TFS ve THI'nın belirlenen konsantrasyonlarının 1:1 oranında karışımlarına 24 saat süreyle maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında ALT, AST ve LDH enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.18'de verilmiştir.

ALT aktivitesinde, TFS+THI karışım etkisine bağlı olarak, uygulama gruplarında konsantrasyonla ilişki göstermeyen aktivite değişimleri saptandı. Buna göre en yüksek ALT aktivitesi kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak % 12 oranında artış göstererek 63.4 ± 1.31 nmol/dk/mg protein düzeyinde 0.2682 mg AI/L THI+ 0.0018 mg AI/L TFS (LC₅₀/50 değeri) karışımına maruz kalan iribaşlarda gözlemlendi. Bu artış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). En düşük ALT aktivitesi ise kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak % 38 oranında azalış göstererek 34.93 ± 0.94 nmol/dk/mg protein düzeyinde 13.41 mg AI/L THI+ 0.09 mg AI/L TFS (LC₅₀ değeri) karışımına maruz kalan iribaşlarda gözlemlendi. LC₅₀ ve LC₅₀/2 değerleri karışımına maruz kalan iribaşlarda ALT aktivitesinin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında bir inhibisyona uğradığı ve bu inhibisyon düzeyinin istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p < 0.05$).

AST aktivitesinin, ALT aktivitesinde olduğu gibi THI+TFS karışımı uygulamasında konsantrasyon artışı ile ilişkisi olmayan değişim gösterdiği belirlendi. En fazla düşüş, kontrol grubuna göre % 14 azalış ile 155.67±1.92 nmol/dk/mg protein olarak 6.706 mg AI/L THI+0.045 mg AI/L TFS'de (LC₅₀/2 değeri) gözlemlendi. Bu azalış kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$). Diğer taraftan, ALT aktivitesinin 0.1341 mg AI/L THI+0.0009 mg AI/L TFS (LC₅₀/100) karışımına maruz kalan iribaşlarda enzim aktivite değerleri kontrol grubuna benzer bir eğilim sergilediği bulundu. THI+TFS'nin 1:1 oranındaki karışım konsantrasyonlarından sadece LC₅₀/50'de görülen artış ile LC₅₀/20, LC₅₀/10 ve LC₅₀'de görülen düşüşler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli olmadığı saptandı ($p>0.05$).

LDH aktivitesinde, LC₅₀/2 değeri karışımına kadar, kontrol grubuna göre artış, LC₅₀/2'den itibaren ise düşüş gözlemlendi. En yüksek ve en düşük LDH aktiviteleri sırasıyla 0.13412 mg AI/L THI+0.0009 mg AI/L TFS'de (LC₅₀/100 değeri) 553.4±28.81 nmol/dk/mg protein olarak ve 13.412 mg AI/L THI+0.090 mg AI/L TFS'de (LC₅₀ değeri) 440.97±15.07 nmol/dk/mg protein olarak gözlemlendi ve LDH aktivitesindeki tüm artış ve azalışların kontrol grubu ile kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli olduğu bulundu ($p<0.05$).

Çizelge 4.18. 24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının ALT, AST ve LDH enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein ± standart hata).

TFS + THI KARIŞIM UYGULAMASI				
Konsantrasyon (mg AI/L)	n	ALT	AST	LDH
<i>KONTROL</i>	4	56.55 ± 1.56	181.65 ± 5.14	480.58 ± 2.30
<i>LC50/100 THI+TFS</i>	3	55.67 ± 0.84	181.43 ± 7.97	553.4 ± 28.81*
<i>LC50/50 THI+TFS</i>	3	63.4 ± 1.31*	186.17 ± 4.74	530.1 ± 7.22*
<i>LC50/20 THI+TFS</i>	3	54.7 ± 1.11	174.13 ± 2.95	541.93 ± 7.16*
<i>LC50/10 THI+TFS</i>	3	58.07 ± 2.09	173.67 ± 1.30	508.97 ± 4.44*
<i>LC50/2 THI+TFS</i>	3	47.87 ± 2.47*	155.67 ± 1.92*	468.6 ± 1.10*
<i>LC50 THI+TFS</i>	3	34.93 ± 0.94*	162.93 ± 7.96	440.97 ± 15.07*

*: $p<0.05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

24 saatlik TFS+THI konsantrasyonlarının 1:1 oranındaki karışımlarına maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında, detoksifikasyon derecesini ve nörotoksik etkilerin belirlenebilmesi için kullanılan GST, CaE ve AChE aktivitelerindeki değişimler Çizelge 4.19.'da verilmiştir.

GST aktivitesinde, TFS+THI karışım etkisine bağlı olarak, uygulama gruplarında konsantrasyonla ilişki göstermeyen aktivite değişimleri saptandı. GST aktivitesinin 0.1341 mg AI/L THI+0.0009 mg AI/L TFS (LC₅₀/100) karışımına maruz kalan iribaşlarda kontrol grubuna benzer bir eğilim sergilerken, en yüksek TFS+THI karışım dozu olan LC₅₀ dozu dışındaki diğer konsantrasyonlarda artış görüldü. Bu artışlar, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$). En yüksek GST aktivitesi, kontrol grubuna göre % 19 artış ile 159.9±4.75 nmol/dk/mg protein olarak 0.2682 mg AI/L THI+0.018 mg AI/L TFS'de (LC₅₀/50değeri) gözlemlendi. En düşük GST aktivitesi ise kontrol grubuna kıyasla yaklaşık olarak % 12 oranında azalış göstererek 118.03±1.73 nmol/dk/mg protein düzeyinde 13.41 mg AI/L THI+0.09 mg AI/L TFS (LC₅₀ değeri) karışımına maruz kalan iribaşlarda gözlemlendi ve kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

CaE aktivitesinde, bütün TFS+THI karışım konsantrasyonlarına maruz kalan iribaşlarda kontrol grubuna göre dozla paralel olmayan düşüşler gözlemlendi ve bu düşüşler kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$). En düşük CaE aktivitesi, kontrol grubuna göre % 47 azalış ile 195.93±3.27 nmol/dk/mg protein olarak 13.412 mg AI/L THI+0.090 mg AI/L TFS'de (LC₅₀ değeri) gözlemlendi.

AChE aktivitesinin, bütün TFS+THI konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre konsantrasyonla paralel olmayan bir şekilde arttığı gözlemlendi. En yüksek AChE aktivitesi, kontrol grubuna göre % 58 artışla 71.43±1.88 nmol/dk/mg protein olarak 13.412 mg AI/L THI+0.090 mg AI/L TFS'de (LC₅₀ değeri) gözlemlendi. Trifloksistrobin+thiakloprid kombinasyonunun bütün doz gruplarındaki artışlar, kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

Çizelge 4.19. 24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının GST, CaE ve AChE enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

TFS + THI KARIŞIM UYGULAMASI				
Konsantrasyon (mg AI/L)	n	GST	CaE	AChE
KONTROL	4	134.2 \pm 3.08	367.25 \pm 10.58	45.28 \pm 1.31
<i>LC50/100 THI+TFS</i>	3	132.53 \pm 12.49	292.1 \pm 8.89*	53.83 \pm 1.14*
<i>LC50/50 THI+TFS</i>	3	159.9 \pm 4.75*	290.2 \pm 7.25*	59.83 \pm 1.60*
<i>LC50/20 THI+TFS</i>	3	153.5 \pm 3.25*	298.77 \pm 2.67*	58.9 \pm 2.65*
<i>LC50/10 THI+TFS</i>	3	153.0 \pm 6.91*	290.13 \pm 7.72*	54.5 \pm 1.84*
<i>LC50/2 THI+TFS</i>	3	158.4 \pm 1.10*	267.37 \pm 6.57*	54.17 \pm 1.05*
<i>LC50 THI+TFS</i>	3	118.03 \pm 1.73*	195.93 \pm 3.27*	71.43 \pm 1.88*

*: $p < 0.05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

Oksidatif stres varlığını ve derecesini ortaya koymak için 1:1 oranında TFS+THI karışımına maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında GR, CAT ve GPx enzim aktivitelerindeki değişimler Çizelge 4.20.'de verilmiştir.

GR aktivitesinde, LC₅₀ karışım uygulaması hariç, bütün TFS+THI konsantrasyonlarında, kontrol grubuna göre artış gözlemlendi ve konsantrasyonla ilintili olmayan bu artışlar, kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak önemsiz bulundu ($p > 0.05$). En yüksek GR aktivitesi, kontrol grubuna göre % 12 oranında artışla 16.23 \pm 0.57 nmol/dk/mg protein olarak 0.2682 mg AI/L THI+0.0018 mg AI/L TFS'de (LC₅₀/50 değeri) gözlemlendi. En düşük aktivite ise yaklaşık % 41 inhibisyon ile 8.5 \pm 0.53 nmol/dk/mg protein olarak, 13.412 mg AI/L THI+0.090 mg AI/L TFS'de (LC₅₀ değeri) ölçüldü ve kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$).

Bütün TFS+THI karışım konsantrasyonlarına maruz kalan iribaşlarda CAT aktivitesinin dozla paralel olmayan bir şekilde azaldığı gözlemlendi ve doz gruplarının hepsinde meydana gelen bu inhibisyonlar kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$). En düşük CAT aktivitesi, kontrol grubuna göre yaklaşık % 56 azalış ile 19.37 \pm 0.35 nmol/dk/mg protein olarak 13.41 mg AI/L thiaklopid+0.090 mg AI/L trifloksistrobinde (LC₅₀ değeri) gözlemlendi.

GPx aktivitesinde, bütün TFS+THI konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre düşüş gözlemlendi. En düşük GPx aktivitesi, kontrol grubuna göre % 49 azalışla 2.60 ± 0.265 nmol/dk/mg protein olarak 0.1341 mg AI/L THI+ 0.0009 mg AI/L TFS'de ($LC_{50}/100$ değeri) gözlemlendi. TFS+THI kombinasyonunun bütün doz gruplarındaki düşüşlerin, kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p < 0.05$).

Çizelge 4.20. 24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının GR, CAT ve GPx enzim aktiviteleri üzerine etkisi (nmol/dk/mg protein \pm standart hata).

TFS + THI KARIŞIM UYGULAMASI				
Konsantrasyon (mg AI/L)	n	GR	CAT	GPx
<i>KONTROL</i>	4	14.5 ± 0.79	44.50 ± 1.13	5.10 ± 0.387
<i>LC50/100 THI+TFS</i>	3	15.87 ± 0.97	$20.13 \pm 1.13^*$	$2.60 \pm 0.265^*$
<i>LC50/50 THI+TFS</i>	3	16.23 ± 0.57	$23.73 \pm 0.43^*$	$4.27 \pm 0.067^*$
<i>LC50/20 THI+TFS</i>	3	15.57 ± 0.26	$30.73 \pm 1.24^*$	$3.27 \pm 0.176^*$
<i>LC50/10 THI+TFS</i>	3	15.03 ± 0.78	$28.93 \pm 1.07^*$	$3.67 \pm 0.273^*$
<i>LC50/2 THI+TFS</i>	3	14.57 ± 0.62	$29.43 \pm 1.04^*$	$4.00 \pm 0.058^*$
<i>LC50 THI+TFS</i>	3	$8.5 \pm 0.53^*$	$19.37 \pm 0.35^*$	$3.70 \pm 0.264^*$

*: $p < 0.05$ kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

Osmoregülasyon metabolizmasında kısa süreli akut toksisite etkilerinin belirlenebilmesi için 1:1 oranında TFS ve THI'nın belirlenen konsantrasyonlarına 24 saat süreyle maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarında ATPaz enzim aktivitelerinde meydana gelen değişimler Çizelge 4.21.'de verilmiştir.

Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin, bütün TFS+THI konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre arttığı gözlemlendi ve kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, bu artışların istatistiksel olarak önemli olduğu saptandı ($p < 0.05$). En yüksek Na^+/K^+ ATPaz aktivitesi, kontrol grubuna göre yaklaşık % 327 artış ile 13.41 mg AI/L THI+ 0.090 mg AI/L TFS'de (LC_{50} değeri) 18.85 ± 0.87 nmol/dk/mg protein olarak bulundu.

Toplam ATPaz aktivitesinde, TFS+THI karışım konsantrasyonlarıyla paralel olmayan ve kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli inhibisyonlar gözlemlendi ($p<0.05$). En fazla düşüş, kontrol grubuna göre yaklaşık % 60 azalışla 18.76 ± 0.80 nmol/dk/mg protein olarak 1.341 mg AI/L THI+ 0.009 mg AI/L TFS'de ($LC_{50}/10$ değeri) bulundu.

TFS+THI karışım konsantrasyonuna bağlı olarak Mg^{+2} ATPaz aktivitesinde kontrol grubuna göre doz ile lineer olmayan artışlar gözlemlendi ve en yüksek Mg^{+2} ATPaz aktivitesinin 13.41 mg AI/L THI+ 0.090 mg AI/L TFS'de (LC_{50} değeri) yaklaşık % 27 oranında artışla 212.69 ± 0.59 nmol/dk/mg protein değerinde olduğu bulundu. Enzim aktivitesindeki bu artışlar kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$).

Ca^{+2} ATPaz aktivitesinde de Mg^{+2} ATPaz aktivitesinde olduğu gibi bütün TFS+THI konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli artışlar gözlemlendi ($p<0.05$) ve en yüksek Ca^{+2} ATPaz aktivitesi 13.41 mg AI/L THI+ 0.090 mg AI/L TFS'de (LC_{50} değeri) yaklaşık % 35 oranında artışla 215.58 ± 3.31 nmol/dk/mg protein değerinde saptandı.

Çizelge 4.21. 24 saatlik TFS+THI uygulamasının ATPaz enzim aktiviteleri üzerine etkisi ($\mu\text{mol/dk/mg protein} \pm$ standart hata).

TFS + THI Karışım Uygulaması					
Konsantrasyon (mg AI/L)	n	Na^+/K^+ ATPaz	Toplam ATPaz	Mg^{+2} ATPaz	Ca^{+2} ATPaz
KONTROL	4	-8.29 ± 0.51	$46,48 \pm 2.00$	$167,89 \pm 2.60$	$159,99 \pm 3.75$
<i>LC50/100 THI+TFS</i>	3	$14,00 \pm 0.36^*$	$26,88 \pm 1.28^*$	$189,89 \pm 2.92^*$	$175,73 \pm 3.51^*$
<i>LC50/50 THI+TFS</i>	3	$12,77 \pm 0.56^*$	$27,74 \pm 0.91^*$	$196,07 \pm 2.73^*$	$178,40 \pm 5.40^*$
<i>LC50/20 THI+TFS</i>	3	$17,99 \pm 0.68^*$	$27,89 \pm 1.20^*$	$194,80 \pm 2.33^*$	$186,00 \pm 3.27^*$
<i>LC50/10 THI+TFS</i>	3	$16,27 \pm 1.10^*$	$18,76 \pm 0.80^*$	$187,10 \pm 2.43^*$	$172,34 \pm 2.35^*$
<i>LC50/2 THI+TFS</i>	3	$16,14 \pm 1.52^*$	$27,60 \pm 0.89^*$	$197,85 \pm 3.20^*$	$186,79 \pm 9.48^*$
<i>LC50 THI+TFS</i>	3	$18,85 \pm 0.87^*$	$20,93 \pm 1.02^*$	$212,69 \pm 0.59^*$	$215,58 \pm 3.31^*$

*: $p<0.05$, kontrol grubu ile karşılaştırıldıklarında istatistiksel önemliliği göstermektedir.

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Dünya genelinde, çeşitli kirleticiler tarafından toprak ve su gibi ekosistem öğelerinin kontaminasyonu hem insan sağlığı hem de diğer tüm canlılar için önemli bir problemdir. Çünkü gerek zirai mücadelede kullanılan pestisitler gerekse çeşitli sanayi faaliyetlerinden kaynaklanan ve kimyasal kirlenmeye neden olan birçok faktör, ekosistemlerde besin zincirinin en alt halkasındaki canlılardan en üst düzeye kadar biyolojik birikim yolu ile taşınabilmektedir.

Amfibiler için yüksek risk taşıyan çevresel kirlilik, dünya genelinde amfibi popülasyonlarının düşüş göstermesiyle ilişkilendirilmektedir. Yapılan son değerlendirmelere göre, dünya genelindeki 7000 amfibi türünden 1,856'sının (%32) tehlike altında olduğu, 168 türün neslinin tükendiği ve en az 2,469 (%43) türe ait popülasyonlarda ise azalma olduğu bildirilmiştir. Popülasyonlardaki bu azalış, özellikle gelişimin belirli erken safhalarında hem sucul hem de karasal yaşam safhalarına sahip amfibilerin çevresel kirleticilere yüksek duyarlılık göstermelerinden kaynaklanmaktadır. Pestisitlerin yoğun olarak kullanıldığı tarımsal arazilere doğal habitatlarının yakın olması ve çoğu amfibi türü için üreme dönemi olan ilkbahar aylarında pestisitlerin yabancı ot, mantar, böcek ve diğer zararlıların kontrolü amacıyla bu arazilere uygulanması, hedef olmayan amfibileri pestisit toksisitesine karşı yüksek derecede savunmasız hale getirmektedir (Linder vd., 2003; Anonim, 2013e).

Uzun yıllardır insektisitlerin ve fungusitlerin toksisitesi üzerine pek çok çalışma yapılmış olmasına rağmen, pestisit kokteyllerinin kombine etkileri ile ilgili çok az bilgi mevcuttur. Bunun nedeni pestisitlerin etkileri değerlendirilirken öncelikle ayrı etkilerine odaklanılmış olmasıdır. Ancak doğada pestisitler kimyasal bir karışım olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle oluşan bu karışımların etkisinin araştırılması gerçek etkilerin ortaya konmasında oldukça önemlidir. Pestisitlerin kombine etkilerinin tahmin edilebilmesi için çeşitli matematiksel modeller geliştirilmiştir. Fakat bu konuyla ilgili çok az deneysel çalışma rapor edilmiştir. Bu çalışmaların çoğunda da sadece insektisit karışımları kullanılmıştır. Ayrıca pestisit karışımlarının balıklar üzerine etkilerini saptamak için yapılan çalışmalara oranla, diğer sucul organizmalar üzerine yapılan çalışmalar oldukça az sayıdadır (Kyle vd., 1993). Oysaki amfibiler farklı gelişimsel dönemlerinde suya bağımlı organizmalardır

ve özellikle erken gelişim evrelerinde çok düşük konsantrasyonlardaki kirleticiler dahi önemli toksik etkilere neden olabilir. Bundan dolayı sucul ekosistemlerdeki çevresel sorunların belirlenmesi için iyi bir biyoindikatör tür olarak kabul edilirler. Biyolojisi iyi bilinmesine ve çok sayıda bilimsel çalışmada deney hayvanı olarak kullanılmasına rağmen *X. laevis*'de pestisit toksisitesinin değerlendirildiği çalışma sayısı sınırlıdır. Aynı zamanda *X. laevis*'de biyobelirteç enzimler kullanılarak çevresel kirliliğin izlendiği çalışma sayısı balık türlerine oranla çok azdır. Buna karşın ekosistemde genelde bir arada bulunan pestisitlerin karışımının çalışıldığı araştırma ise bulunamamıştır.

Bu çalışma, neonikotinoid insektisit grubuna giren thiakloprid (THI) ile strobilurin fungusit grubuna giren trifloksistrobin (TFS)'in *in vivo* koşullarda tek tek ve karışım halinde buldukları zaman *Xenopus laevis* iribaşlarında ortaya çıkan akut toksik etkileri araştırmak, tek tek ve karışım halinde kullanıldıklarında ortaya çıkan bu akut toksik etkileri karşılaştırarak seçilen pestisitlerin additif, sinerjistik ya da antagonistik etki gösterip göstermediklerini ve bu etkilerin belirlenmesi amacıyla kullanılan enzimlerin uygun biyoindikatör olup olmadığını belirlemek amacıyla planlanmıştır. Bu nedenle, bu bölümde önce test maddelerinin tek tek kullanıldıkları zaman meydana getirdikleri akut toksik etkiler ve daha sonra karışım halinde kullanıldıkları zaman ortaya çıkardıkları akut toksik etkiler tartışılacaktır.

Seçilen pestisitlerin tarımsal arazilerdeki uygulama konsantrasyonları yüksek olmasına rağmen, bu kimyasalların sudaki dağılım oranları oldukça hızlıdır ve çevredeki yarılanma ömürleri kısadır. Bununla birlikte, 50-58. evredeki *Xenopus laevis* iribaşlarında biyokimyasal parametreler üzerine bu seçilen pestisitlerin kısa süreli etkilerinin değerlendirilmesi, çevresel koşullar altında bu kimyasallara ait toksik etki mekanizmalarının anlaşılması için bir bilgi teşkil edecektir. Yapılan bu araştırmanın sonuçlarına göre, test materyali olarak kullanılan iki farklı pestisit ve bunların karışımlarının *X. laevis* iribaşları üzerinde toksik etkilere neden oldukları görülmektedir. Bununla birlikte, hipotezimize uygun olarak uygulanan pestisit karışımlarının pestisitlerin tek başlarına olan etkilerine kıyasla daha toksik oldukları belirlendi. Her iki pestisit (THI ve TFS) ve pestisit karışımları ile yapılan çalışmalarda özellikle en yüksek konsantrasyonda bütün iribaşların kısa sürede öldüğü saptandı.

Yapılan toksisite çalışmaları sonucunda THI ve TFS'nin LC₅₀ değerleri sırası ile 13.412 ve 0.09 mg AI/L olarak hesaplanmış olup, pestisitlerin ortalama öldürücü konsantrasyonları arasında TFS>THI ilişkisi belirlenmiştir. Ayrıca pestisitlerin NOAEC değerleri arasında da benzer bir ilişki saptanmıştır. Özellikle TFS'nin LC₅₀ değerlerinin oldukça düşük konsantrasyonda hesaplanması, bu pestisitlerin iribaşlar için yüksek toksik etkiye sahip olduğu şeklinde değerlendirilebilir.

Çalışma sonucuna göre NOAEC ve LC₅₀ değerlerinin birbirlerine oldukça yakın değerlerde bulunması nedeniyle bir LOAEC konsantrasyonu hesaplanamadı. Bu durumda kullanılan pestisitlerin *Xenopus* iribaşlarında öldürücü etkisinin belli bir konsantrasyon üzerinde, doğrudan organizmanın fizyolojik ve/veya biyokimyasal mekanizması ile bağlantılı olduğu düşünülmektedir.

Yaptığımız çalışmada THI'nin *Xenopus laevis* için bulunan 96 saatlik LC₅₀ değeri olan 13.41 mg AI/L, EPA, WHO ve EC tarafından yapılan risk sınıflandırmasına göre, ikinci kategoride yer almakta ve *X. laevis* iribaşları için kısmen toksisite göstermektedir. Tarımsal ve veteriner kimyasalların tescillendirilmesinden sorumlu Avusturalya Ulusal Komitesi (2001), THI içerikli ticari insektisit Calypso 480 SC'nin *Lepomis macrochirus* ve erken gelişim evrelerindeki *Oncorhynchus mykiss* için 96 saatlik LC₅₀ değerlerinin sırasıyla 16.7 ve 28.4 mg AI/L ve 27.0-34.1 mg AI/L (orta derecede toksik) olduğunu bildirmişlerdir. Benzer şekilde, Schmuck (2001) yaptığı çalışmada, *Danio rerio* ve *Oncorhynchus mykiss* üzerinde THI'nin toksisitesini incelemiş ve 96 saatlik LC₅₀ değerlerini sırasıyla 19.7 ve 30.5 mg AI/L olarak belirlemiştir. Şimdiye kadar incelenen neonikotinoid pestisitler arasında THI'nin balıklar için nispeten yüksek bir seviyede toksisite gösterdiği Tomizawa ve Casida (2005) tarafından yapılan derlemede belirtilmiştir.

Çalışmamızda, TFS'nin *X. laevis* için bulunan 96 saatlik LC₅₀ değeri 0.09 mg AI/L olarak hesaplanmış olup, bu değer EPA tarafından yapılan toksisite sınıflandırmasına göre çok zehirli olarak sınıflandırılmaktadır. TFS, toprak ve sucul ortamda çok hızlı bir şekilde yıkıma uğramasına rağmen, serbest asit metabolitleri ana bileşiğe göre daha yavaş yıkıma uğrayabilmektedir. Ayrıca, TFS'nin balık ve suda yaşayan omurgasızlar için çok zehirli olarak sınıflandırılmasına rağmen, suda nispeten düşük maruziyet konsantrasyonlarında bulunmasından dolayı, balık ve sucul

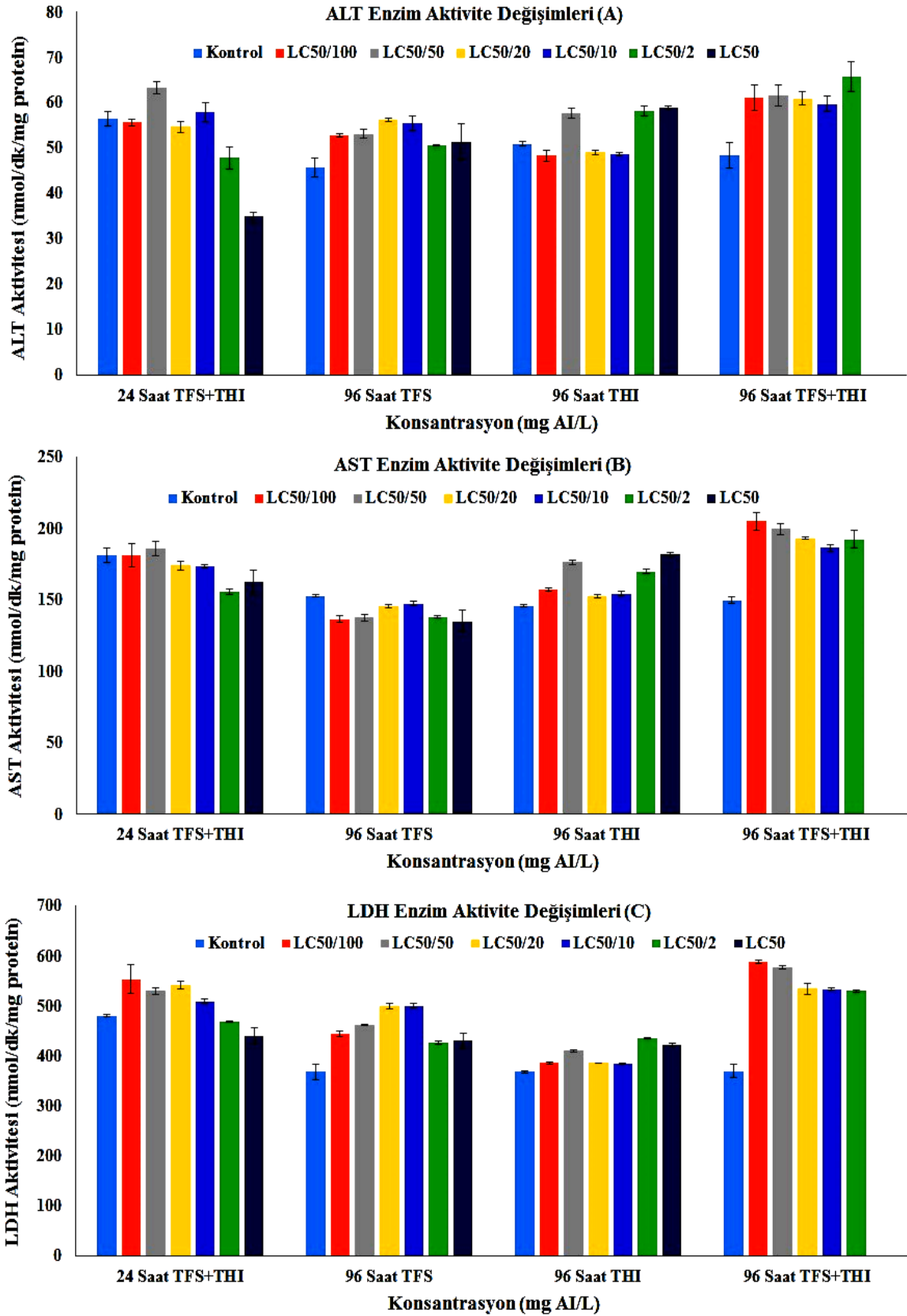
omurgasızlar için düşük risk gösterdiği belirtilmiştir. TFS'nin balıklar için 96 saatlik LC₅₀ değerleri, 0.015 mg/L ile 0.52 mg/L arasında değişirken, sucul omurgasızlarda 48 saatlik EC₅₀ değerleri, 0.011 mg/L ve 0.20 mg/L arasında değişmektedir (European Commission, 2003; EPA, 2002). Belden ve arkadaşları (2013), yaptıkları bir çalışmada TFS ve ticari formu olan Stratego formulasyonunun *Bufo cognatus* iribaşları için 72 saatlik LC₅₀ değerlerini sırasıyla 104 µg/L ve 100 µg AI/L olarak bildirmişlerdir. (Hooser vd., 2012).

Araştırmada kullanılan pestisit ve kombinasyonlarının seçilen biyobelirteç enzimler üzerinde farklı etkilere yol açtığı görülmektedir. Bu da pestisitlerin toksisite mekanizmalarının farklı olabileceğini göstermektedir.

Çalışmamızda kullandığımız bir fungusit olan lipofilik özelliğe sahip trifloksistrobin (TFS) mitokondri iç membranında bulunan ve elektron taşıma sisteminin bir elemanı olan sitokrom *bc₁* enzim kompleksinin (Kompleks III: integral membran protein kompleksi) kinol (ubikinol) oksidasyon (Q₀) bölgesine bağlanarak sitokrom *b* ve sitokrom *c₁* arasındaki elektron transferini bloke eder ve redükte NADPH oksidasyonunu ve ATP sentezini engelleyerek hücresel solunumu sekteye uğratar. Enerji üretiminin durması, canlının ölümüne neden olur (Bartlett vd., 2002; Balba 2007; Fernández-Ortuño vd., 2010). TFS'nin sucul organizmalar üzerindeki etkisini araştırmak için yapılmış antioksidan, detoksifikasyon, hücre ve osmoregülasyon metabolizması enzimleri ile ilgili literatüre rastlanılmamıştır.

Hesaplanan LC₅₀ konsantrasyonuna bağlı olarak, iribaşların maruz bırakıldıkları doz değerleri sucul ekosisteme karışması sonucunda organizmaların bu pestisitlere maruz kalabilecekleri düşük doz değerlerini temsil edebilecek düzeylerde olması bakımından (özellikle LC₅₀/50, LC₅₀/100 dozları) önemli olduğu kanaatindeyiz. Buna bağlı olarak, 96 saat süreyle TFS'nin letal ve subletal konsantrasyonlarına (LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/10, LC₅₀/20, LC₅₀/50, LC₅₀/100) maruz bırakılan *X. laevis* iribaşlarında, ALT ve LDH enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre önemli düzeyde artış, AST aktivitesinde ise azalış gözlenmiştir (p<0.05) (Şekil 5.1. A, B ve C). Karaciğer LDH ve transaminaz (AST ve ALT) enzimleri, hepatoksisite ve histopatolojik değişimlerin daha hassas ve daha kısa sürede değerlendirilmesinde kullanılabilen karaciğer özgül enzimleridir (Rao, 2006). Ksenobiyotiklerin etkileri nedeniyle gerçekleşen doku tahribatının bir sonucu olarak

meydana gelen hipoksik koşullarda, mitokondride oksidatif fosforilasyon engellendiği için ATP retimi azalırken, karaciğer LDH aktivitesinin arttığı belirlenmiştir (Gl, 2004). AST ve ALT, hepatoksisitenin tanımlanmasında kullanılabilir duyarlı belirteçler arasındadır. Bu çalışmada, yüksek transaminaz aktivitesinin (ALT), TFS'nin iribaşlarında patolojik değişimleri indklemesinin bir sonucu olduğu düşünülebilir. Bu sonuç, TFS'nin aktif bölgeye bağlanarak AST aktivitesini inhibe etmesinden kaynaklanabileceği gibi AST gen ifadesinin negatif olarak düzenlenmesinden sorumlu mekanizma ile ilişkili olabileceğini de gösterebilir (Aydin, 2011). Aydin-Sinan vd. (2012), 46. evredeki *X. laevis* iribaşlarını 168 saat boyunca, piretroid insektisitler olan deltametrin ve λ -siyahalotriner maruz bırakması sonucu her iki insektisit AST aktivitesinde inhibisyona neden olduğunu sonucu, çalışmamızla benzerlik göstermektedir.



Şekil 5.1. 96 saatlik TFS, THI ve TFS+THI karışım uygulamaları ile 24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının ALT (A), AST (B) ve LDH (C) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Çeşitli ksenobiyotiklerin etkilerinin belirlenmesinde GST'nin kullanışlı bir biyokimyasal belirteç olduğu birçok çalışmada gösterilmiştir. Çeşitli ksenobiyotiklerin hücrel detoksifikasyonunda önemli rol oynayan ve bir Faz II detoksifikasyon enzimi olan GST, toksik ajanları suda çözünür hale getirip nötralize ederek, hücreleri toksisiteye karşı korumaktadır. Yaptığımız çalışmada, GST aktivitesi bütün TFS konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre önemli artışlar göstermiştir ($p<0.05$) (Şekil 5.2. A). GST aktivitesinde, özellikle antioksidan savunma sisteminin elemanı olan bu enzimlerdeki artışlar, literatürdeki farklı pestisit ve türlerle yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ile de benzerlik göstermektedir. GST aktivitesinin artışı, kirleticilerin neden olduğu strese organizmanın gösterdiği adaptasyon olarak değerlendirilmektedir (Güngördü, 2007). Yetişkin *Bufo regularis*'in serum, beyin, karaciğer ve gastrointestinal kanal ve akciğerlerinde, diazinon maruziyeti sonrasında GST aktivitesinde önemli derecede artış gözlemlendiği Ezemonye ve Tongo (2010) tarafından yapılan çalışmada gösterilmiştir. Gillardin vd. (2009) tarafından poliklorlu bifenil (PCB) pestisitlerden Aroklor 1254'ün 0.1 ve 1 mg/L'lik dozlarına maruz bırakılan *Xenopus laevis* iribaşlarında antioksidan sistemlerin araştırıldığı çalışmada, her iki konsantrasyon maruziyetinin, kontrol grubuna göre GST aktivitesini istatistiksel olarak önemli düzeyde arttırdığı ($p<0.05$) ve gelişimin erken evrelerindeki *X. laevis* iribaşlarının antioksidan sistemlerdeki değişimlerin değerlendirilmesine ışık tuttuğu vurgulanmıştır.

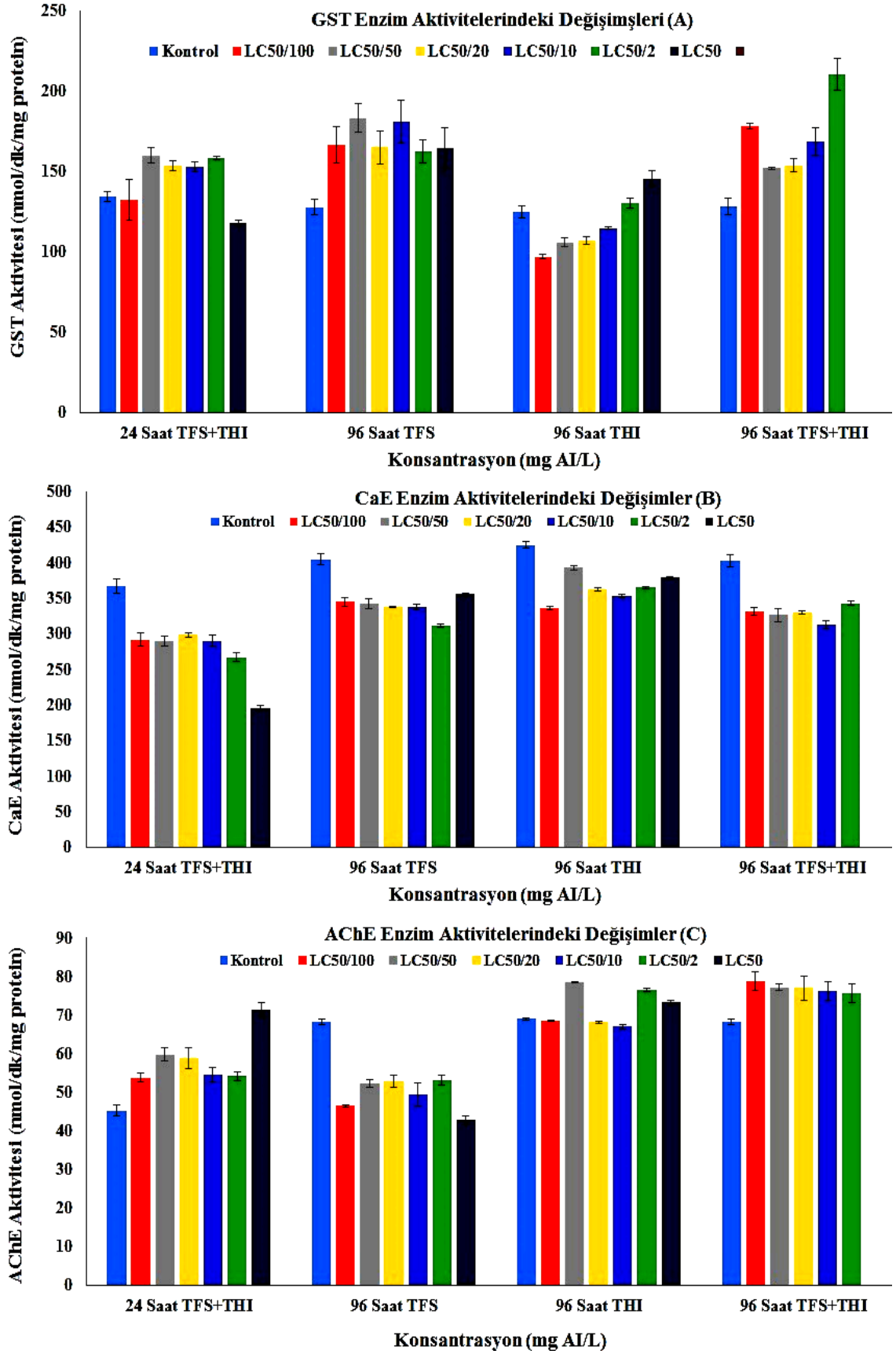
Araştırma sonuçlarımıza göre 96 saat süreyle farklı konsantrasyonlarda TFS'ye maruz bırakılan 50-58. evredeki *X. laevis* iribaşlarında CaE aktivitesinin önemli düzeyde inhibisyona uğradığı görülmektedir ($p<0.05$) (Şekil 5.2. B). Literatürdeki farklı pestisit ve türlerle yapılan çalışmalardan elde edilen veriler, çalışmamızda bulduğumuz CaE aktivitesindeki inhibisyonlar benzerlik göstermektedir. Güngördü (2013), glifosat ve metidasyonun subletal konsantrasyonlarına 96 saat süreyle maruz bırakılan *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis* ve *Xenopus laevis* amfibi türlerine ait erken gelişim evrelerindeki iribaşlarda CaE aktivitesinde istatistiksel olarak önemli düşüşler gösterdiğini belirtmektedir. Ferrari ve arkadaşları (2007) karbaril ve azinfos metilin subletal konsantrasyonlarına 24, 48 ve 96 saat süreyle maruz bırakılan *Oncorhynchus mykiss*'de CaE'nin önemli derecede inhibe olduğunu göstermiştir. Yapılan başka bir çalışmada Robles-Mendoza ve arkadaşları (2011), organofosfat türü bir pestisit olan klorpirifosun (CPF) 0.05 and 0.1 mg CPF/L

dozlarına 48 saat boyunca maruz bırakılan neotenik bir semender türü *Ambystoma mexicanum*'da CaE ve AChE aktivitelerinin sırasıyla ~%50 ve >%50 oranında inhibisyona uğradığı rapor edilmiştir. Hidroliz yoluyla birçok pestisit detoksifikasyonunda önemli rol oynayan faz I enzimi CaE'nin, aktivitesindeki inhibisyon, CaE'nin AChE'nin ksenobiyotikler ile etkileşime girmesini engellemek ya da geciktirmek suretiyle inhibisyona uğramasını önleyici ya da koruyucu aktivitesi olarak yorumlanmıştır. (Jokanoviç, 2001; Wheelock vd., 2005; Laetz vd., 2009).

TFS'nin letal ve subletal konsantrasyonlarına (LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/10, LC₅₀/20, LC₅₀/50, LC₅₀/100) 96 saat süreyle maruz bırakılan *X. laevis* iribaşlarında, AChE enzim aktivitelerinde konsantrasyon artışı ile paralel olmasa da kontrol grubuna göre önemli düzeyde inhibe olduğu gözlenmiştir (p<0.05) (Şekil 5.2. C). İribaşların ölüm periyoduna girmesiyle baskılanan protein sentezinin bir sonucu olarak AChE aktivitesinde inhibisyon meydana geldiği düşünülebilir. AChE aktivitesinde, özellikle nörolojik sistemi elemanı olan bu enzimdeki inhibisyonlar, literatürdeki farklı pestisit ve türlerle yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ile de benzerlik göstermektedir. AChE inhibisyonu, sucul ve karasal ekosistemlerde organofosforlu (OP) insektisitlere maruz kalmanın bir biyobelirteci olarak ve maruz kalan hayvanda fizyolojik etkilerin belirlenmesi için yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Fulton ve Key, 2001).

Literatür bilgilerimize göre, OP pestisitler CaE ve AChE gibi esterazları da kapsayan çeşitli enzimlere bağlanma affinitesi göstermektedir (Lockridge ve Schopfer, 2006). Bir çalışmada, *in vivo* koşullarda methidathionun 2 mg/L dozuna 5 gün süreyle maruz bırakılan balıkların farklı dokularında AChE aktivitesinde % 70-90 oranında azalış gösterdiği ve bu inhibisyonun yüzme aktivitesi, beslenme ve kaçma davranışlarında dengesizliğe yol açtığı ve ölümlerle sonuçlandığı bildirilmiştir (Balint et al., 1995). Fakat çalışmamızda kullandığımız TFS, OP pestisit sınıfına ait olmamasına rağmen, genel olarak AChE aktivitesinde önemli bir inhibisyona neden olmuştur. Xuereb ve arkadaşları (2009) yaptıkları çalışmada 24, 48 ve 96 saat boyunca OP bir pestisit olan chlorpyrifos'a maruz kalan *Gammarus fossarum*'un AChE aktivitesinde kontrole göre önemli düzeyde bir inhibisyon tespit etmişler. Dutta ve Arends (2003) bir balık türü olan *Lepomis macrochirus* ile yaptıkları

çalışmada canlıyı 24, 48, 72, 96 saat boyunca 1.0 µg/L (LC50: 1.2 µg/L iken) endosulfana maruz bıraktıktan sonra beyindeki AChE aktivitesindeki değişikliği incelemiş, AChE aktivitesinin farklı zaman aralıklarında kontrole göre inhibe olduğunu tespit etmişlerdir. Cater (1971) yaptığı çalışmada farklı balık türlerindeki AChE aktivitelerinin bile farklılıklar gösterdiğini tespit etmiştir. Barron ve Woodburn (1995), ksenobiyotik dozuna bağlı olarak, AChE'nin inhibe olması durumunda, sinapslarda biriken aşırı asetilkolin başlangıçta hiperaktivite sonrasında kaslarda kontrolsüz spazma ve felce, solunum yetmezliğine ve ölüme neden olabileceğini rapor etmişlerdir. Bu durumlar, çalışmamızda TFS'ye maruz bırakılan iribaş davranışları ile benzerlik göstermektedir.



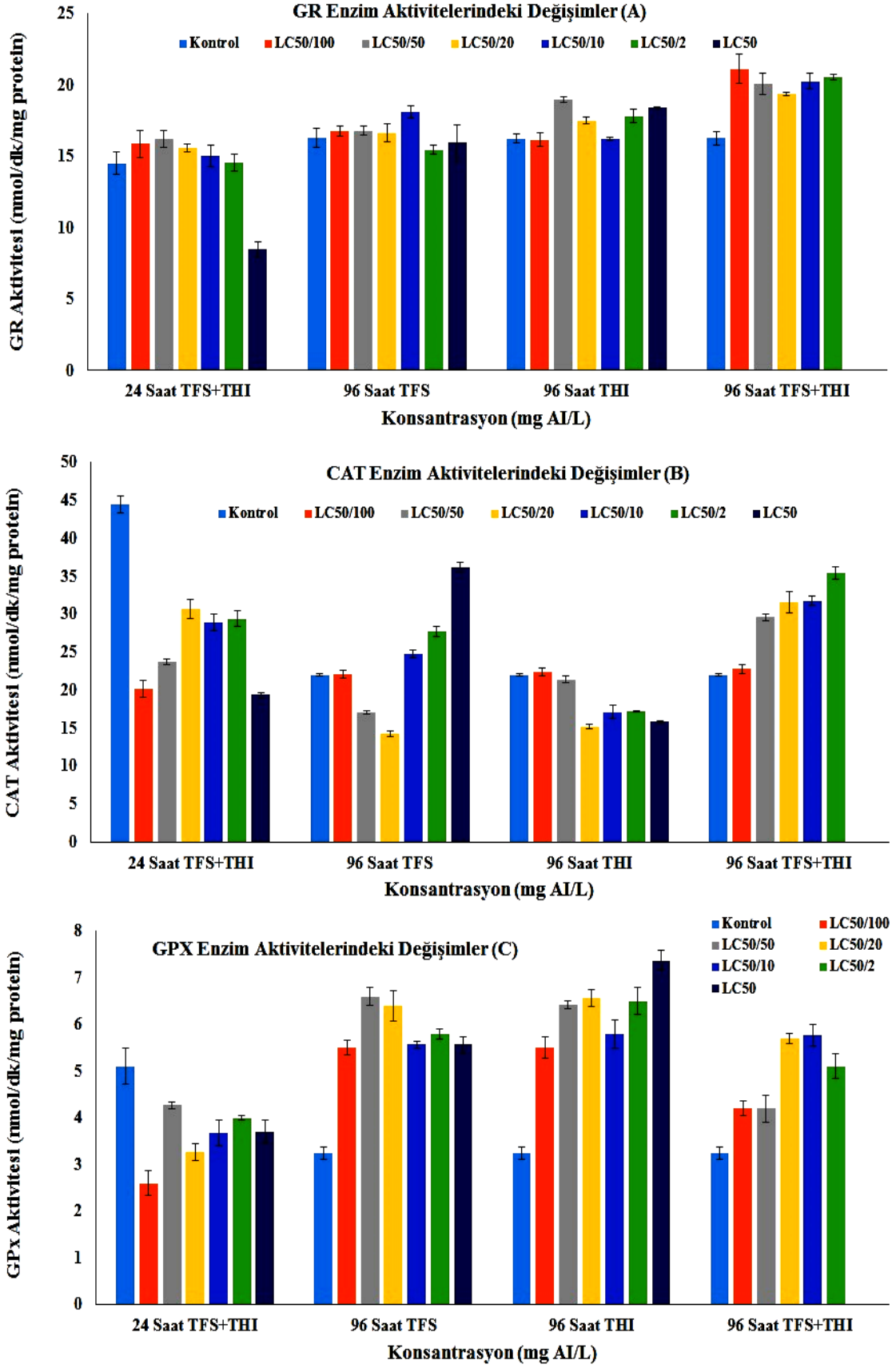
Şekil 5.2. 96 saatlik TFS, THI ve TFS+THI karışım uygulamaları ile 24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının GST (A), CaE (B) ve AChE (C) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

GR aktivitesi, TFS'ye maruz kalan iribaşlarda konsantrasyon artışı ile paralel olmayan değişimler belirlenmesine rağmen, bu değişimlerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak da önemli olmadığı saptandı ($p>0.05$) (Şekil 5.3. A).

CAT aktivitesinde, TFS konsantrasyonlarıyla ilişkisi olmayan değişimler gözlemlendi. CAT aktivitesinin en yüksek konsantrasyonlarda (LC_{50} , $LC_{50}/2$, $LC_{50}/10$) dozla ilişkili olarak kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde artış, düşük konsantrasyonlarda ($LC_{50}/20$ ve $LC_{50}/50$) ise kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azalış göstermiştir ($p<0.05$) (Şekil 5.3. B). Korkutan vd. (2008) *Rana ridibunda*'nın kas dokusunu 10 mM'lık indoxacarb çözeltisine bir saat maruz bıraktıklarında CAT aktivitesinin kontrol grubuna göre önemli düzeyde indüklendiğini tespit etmişlerdir. Yapılan bir başka çalışmada Guo ve arkadaşları (2009) bir akarisit olan fenpyroximatenin 12 nM subletal konsantrasyonuna 48 saat süreyle maruz bırakılan *Paralichthys olivaceus* türü dilbalığının solungaç ve karaciğerinde CAT aktivitesinin istatistiksel açıdan önemli bir artış gösterdiğini rapor etmişlerdir. CAT aktivitesinin kontrole göre indüklenmesi oksidatif strese karşı antioksidan savunma mekanizmasının harekete geçtiği anlamına gelebilir (Mudaraddi vd., 2012). Santos ve Martinez (2012), atrazinin 2 ve 10 µg/L'lik konsantrasyonlarına 24 ve 48 saat maruz kalan neotropikal bir balık türü *Prochilodus lineatus*'un karaciğer hücrelerinde SOD, CAT, GR ve GPx, beyin ve kas hücrelerinde ise AChE enzimlerinde oluşan değişiklikleri incelemişler ve enzim aktivitelerinde 24 ve 48 saat sonunda konsantrasyona bağlı bir farklılık gözlememişlerdir. Fakat, atrazine maruz kalan *Prochilodus lineatus*'da sadece CAT enzim aktivitesi kontrole göre önemli düzeyde inhibe olduğunu rapor etmişlerdir. Yaptığımız çalışmada CAT aktivitesinde görülen artış ve azalışlar, TFS maruziyeti sonucu meydana gelebilecek reaktif oksijen türündeki (ROS) üretim artışının CAT aktivitesi indüklemesi ya da aktif merkezindeki hem grubuna ROS türlerinin doğrudan bağlanması sonucu CAT aktivitesinin inhibisyona uğraması şeklinde yorumlanabilir (Ferrari vd., 2009).

Yaptığımız çalışmada, bütün TFS konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre GPx aktivitesinde indüksiyon görülmüştür ($p<0.05$) (Şekil 5.3. C). Özellikle, antioksidan savunma sisteminin elemanları olan GPx aktivitesindeki artışlar, literatürdeki farklı tür ve ksenobiyotiklerle yapılan çalışmalar ile benzerlik

göstermiştir. Thomas ve Wofford (1993) tarafından yapılan çalışmada 17 gün boyunca Aroklor 1254 (poliklorlu bifenil karışımı)'e maruz bırakılan *Micropogonias undulatus*'un karaciğer ve ovaryum dokularında GPx aktivitesinin arttığı rapor edilmiştir. Vieira ve arkadaşları (2008) poliaromatik hidrokarbon türleri olan Benzo[a]piren (BaP) ve antrasen'nin farklı konsantrasyonlarına tek tek 96 saat süreyle maruz bıraktıkları *Pomatoschistus microps* türü kayabalığında AChE, LDH, GST, GR, GPX, CAT ve SOD aktivitelerindeki değişimleri incelemişlerdir. Seçilen PAH'ların yüksek konsantrasyonlarda, CAT, SOD, GR, GPx, LDH aktivitelerinde artışa, AChE aktivitesinde ise inhibisyona neden olduğu ($p<0.05$), GST aktivitesinde BaP artışa neden olurken, anthracenenin ise GST aktivitesini inhibe ettiği rapor edilmiştir ($p<0.05$). Antioksidan enzimler, oksitleyici ortama karşı bir savunma mekanizması olarak görev alırlar ve yeni koşullara canlının adapte olmasında yardımcı olurlar. GPx ve GST'nin birlikte lipid peroksidasyonuna karşı birlikte antioksidan etkisi gösterdikleri bilinmektedir. Ayrıca GPx, CAT'ın H₂O₂'ye affinitesinin düşük olması nedeniyle hidrojen peroksitin hücrelerde uzaklaştırılmasında esas antioksidan enzim olarak görev almaktadır (Izawa vd., 1996; Vieira vd., 2008). Bütün bunlar dikkate alındığında, TFS maruziyeti sonucu görülen GPx aktivitesindeki artışın, iribaşların oksidatif strese vermiş olduğu yanıt olarak düşünülebilir.



Şekil 5.3. 96 saatlik TFS, THI ve TFS+THI karışım uygulamaları ile 24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının GR (A), CAT (B) ve GPx (C) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

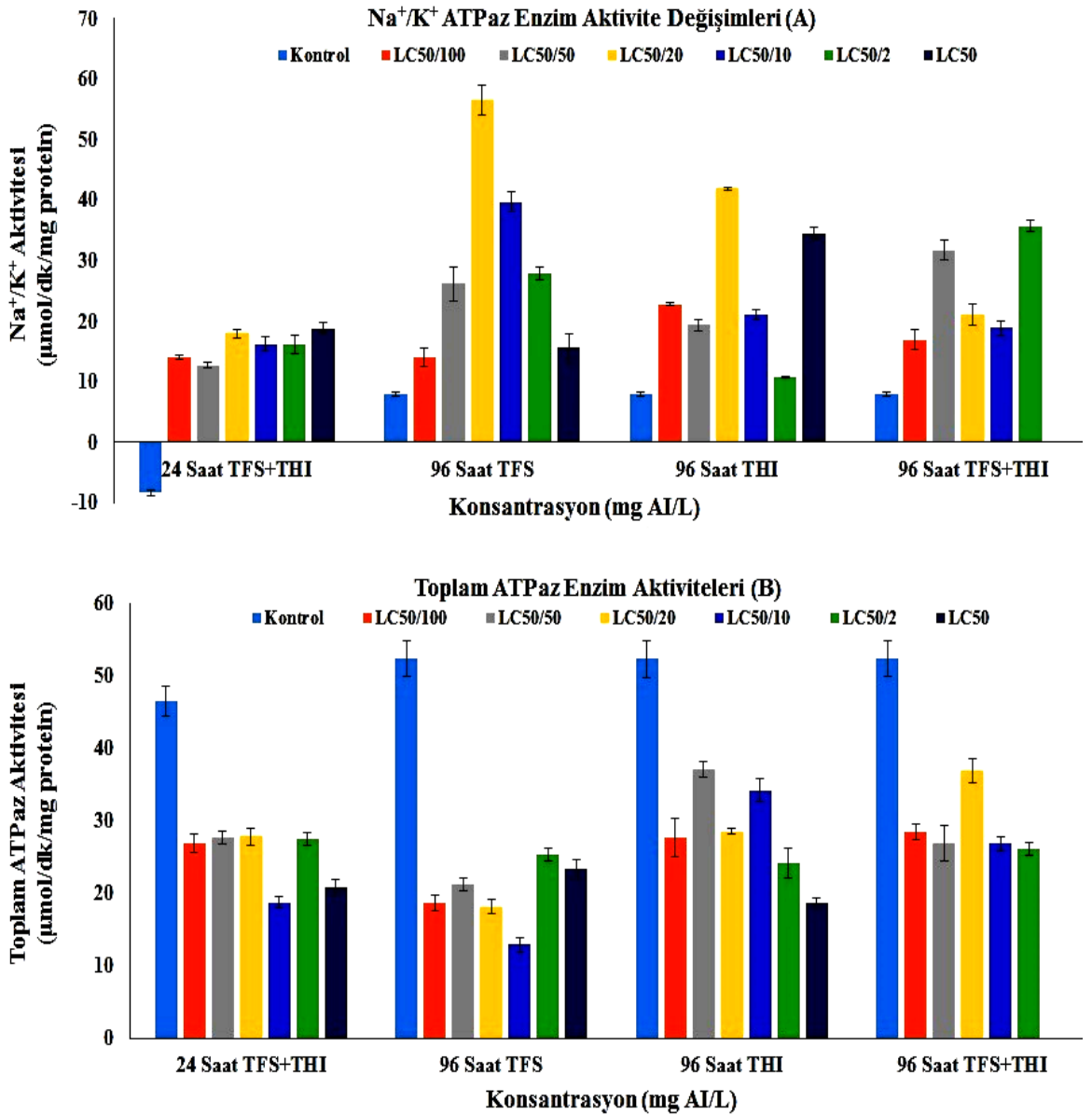
ATPaz enzimleri oldukça hassas olan ve çevresel koşullardan en fazla etkilenen enzimler arasındadır. Bu nedenle farklı çalışmalar arasında enzim aktiviteleri bakımından farklı değerlerin bulunması sıklıkla karşılaşılabilmektedir. Balık ATPaz aktiviteleri aynı grup hayvanlar arasında, hatta farklı mevsimlerde, farklı laboratuvar koşullarında bile değişebilmektedir. Bunlardan Na^+/K^+ -ATPaz, hem deniz hem tatlı su kemikli balıklarının özellikle solungaç, böbrek ve bağırsak gibi osmoregülatör organlara özgü bir enzimdir. Bu enzim hücre içi homeostazisin korunmasından sorumlu olup, 3 Na^+ iyonunu hücre dışına 2 K^+ iyonunu hücre içine taşıyarak osmotik dengeyi sağlamaktadır. Bunun için gerekli olan enerji ATP den sağlanmaktadır. (Heath, 1987; Diaz vd., 1998; Ribeiro vd., 2002). Mg^{+2} -ATPaz ise hücre zarının bütünlüğü ve geçirgenliğinin korunmasında görev alan bir enzim olup Mg^{+2} 'nin taşınmasından sorumludur. Özellikle mitokondriyal zarlarda bulunan Mg^{+2} -ATPaz, önemli enerji ilişkili bir enzimdir ve Mg^{+2} -ATPaz inhibisyonu oksidatif fosforilasyonu etkilemektedir. Pestisit etkilerinde Mg^{+2} -ATPaz aktivitesinde gözlenen azalma, enzimin oksidatif fosforilasyonda görev alması nedeniyle ATP üretiminin indirgenmesine yol açabilmektedir (Parvez vd., 2006). Ca^{+2} -ATPaz ise sarkoplazmik retikulum tübüllerinde lokalize olmakta olup, hücre zarının stabilizasyonu için gerekli olan Ca^{+2} iyonlarının varlığı ile aktive olmaktadır. Bu enzimde ATP hidrolizinden açığa çıkan enerjiyi kullanarak sitoplazmadan Ca^{+2} iyonlarının uzaklaştırılmasını sağlayarak hücre içeriğindeki düşük Ca^{+2} seviyesinin korunmasında görev almaktadır (Watson ve Beamish, 1980; Saxena ve ark., 2000). Bu bilgiler ışığında akut pestisit etkisi sonucunda iribaşlarda Ca^{+2} -ATPaz aktivitesinde görülen azalmalar, pestisitlerin Ca^{+2} -ATPaz yapısındaki -SH gruplarına bağlanarak konformasyonel değişikliğe neden olması sonucu enzimi inhibe etmesinden, Ca^{+2} homeostazisinin bozulmasından, oksijen radikallerinin yıkıcı rolünden veya doku hasarından kaynaklanabilmektedir. (Kukreja vd., 1988; Larsson vd., 1985; Simkiss ve Taylor, 1989).

Genel olarak, enzim aktivitesinde gerçekleşen azalışlar osmoregülasyon sistemindeki bozulmalardan veya hücre zarında oluşan yapısal hasarın sonucunda zar geçirgenliğinin değişmesinden kaynaklanabilmektedir. Bununla birlikte ksenobiyotiklerin enzim yapısındaki -SH gruplarına bağlanarak konformasyonel değişiklikler, dokudaki yapısal farklılıklar ile bunlara bağlı gelişen iyon ve osmoregülatör sistem bozuklukları aktivitede azalmaya neden olabilmektedir. Bunun

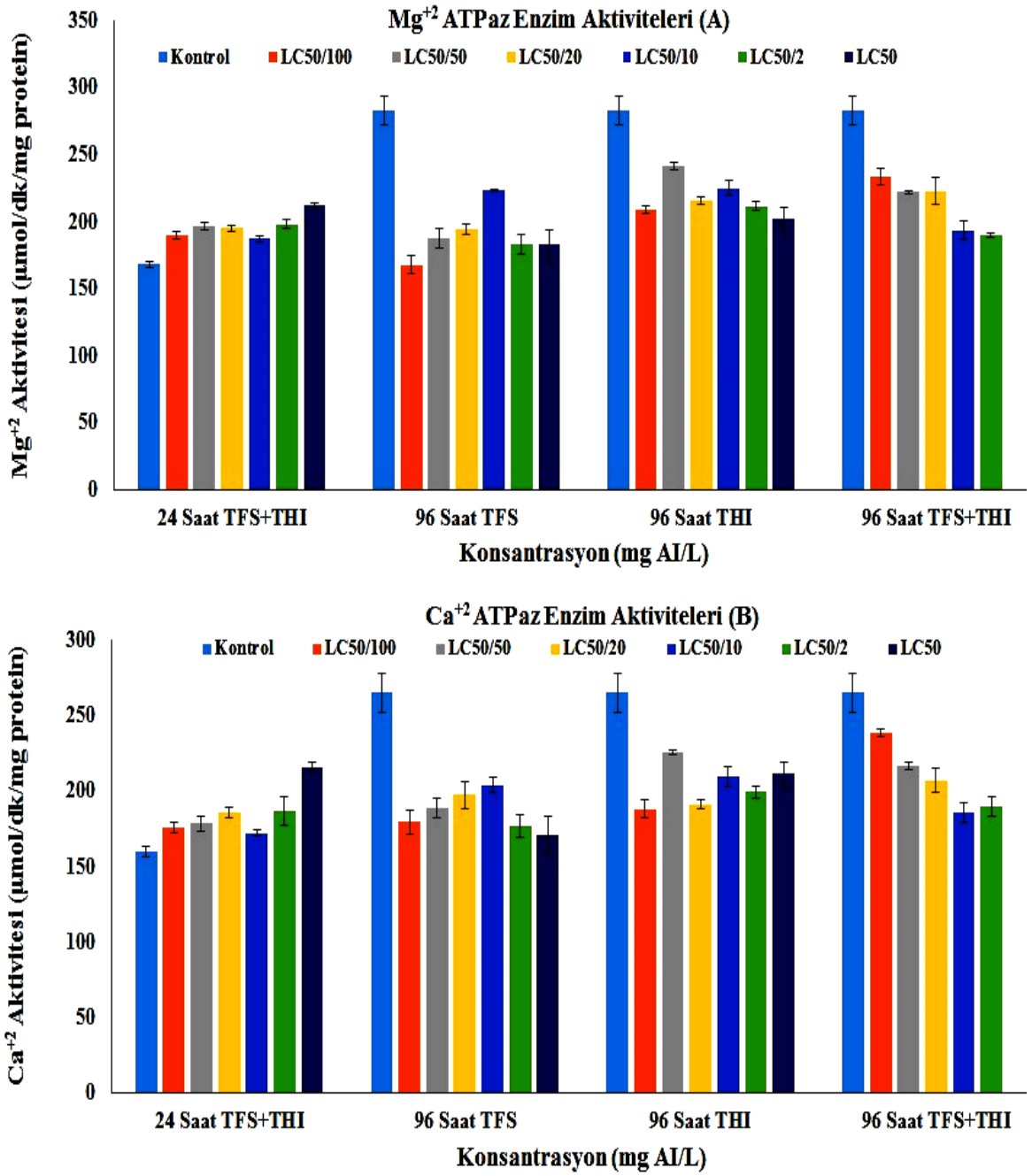
dışında enzim aktivitesinde özellikle akut süreçte gözlenen Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesindeki artışlar ise antioksidan sistemler gibi olası telafi ve onarım mekanizmalarının devreye girmesi (Doğan, 2013) veya toksik etki sonucu osmoregülasyonda gerçekleşen ve iyon taşınımını olumsuz etkileyen durumun telafisi için Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin artması şeklinde yorumlanabilir. De La Torre vd. (2007), balıkta Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesinin su kaynaklı kirleticilerin akut veya kronik etkileri sırasında artış veya azalış göstermesinin yanında herhangi bir değişiklik göstermeyebileceğini de belirtmiştir. Bu tepkilerin kirleticilerin yoğun etkilerine ve epitelyal taşınmanın fonksiyonel ve morfolojik bütünlüğünün bozulmasına bağlı olarak geliştiğini vurgulamışlardır. Bu nedenle de bu enzimlerin değişen ortam koşullarına verdikleri cevabın stresin sınıflandırılmasında ve metabolik uyum düzenlemelerinin yapılmasında önem kazandığını belirtmişlerdir.

Çalışmamızda, bütün TFS konsantrasyonlarına 96 saat süreyle maruz bırakılan *X. laevis* iribaşlarında Na^+/K^+ ATPaz aktivitesindeki artış ile toplam, Mg^{+2} ve Ca^{+2} ATPaz aktivitelerindeki inhibisyon kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak önemli görülmüştür ($p<0.05$) (Şekil 5.4. A, B; Şekil 5.5. A, B). ATPaz aktivitelerindeki bu değişimler, literatürdeki farklı tür ve ksenobiyotiklerle yapılan çalışmalar ile benzerlik göstermiştir. Sancho ve arkadaşları (1997) bir OP bileşiği olan fenitrothionun subletal konsantrasyonlarına (0.02 ve 0.04 mg/L) 4 gün boyunca maruz bırakılan Avrupa elektrik balığı olan *Anguilla anguilla* solungaçlarında toplam ve Mg^{+2} ATPaz aktivitelerini maruziyetten 2, 8, 12, 24, 32, 48, 56, 72 ve 96 saat sonrasında değerlendirmişlerdir. Toplam ve Mg^{+2} -ATPaz aktivitelerinin artan fenitrotiyonun konsantrasyonu ile paralel olarak azaldığı rapor edilmiştir ($p<0.05$). Üner vd. (2005) yeni bir akarisit olan Etaksol'un subletal konsantrasyonlarına 1, 7 ve 15 gün süreyle maruz bıraktıkları *Oreochromis niloticus*'un solungaç, kas ve böbrek dokularında Na^+/K^+ ATPaz aktivitelerindeki değişimleri incelemiş ve etoxazole maruziyeti sonrasında solungaç ve kas dokularında Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin arttığını rapor etmişlerdir ($p<0.05$). Balasundaram vd. (1995) tarafından yapılan bir çalışmada, bir OP pestisit olan fosolonun akut dozuna 96 saat boyunca maruz bırakılan yetişkin *Rana tigrina*'nın merkezi sinir sisteminde ATPaz aktivitelerindeki değişimler incelenmiş ve Mg^{+2} ATPaz ile Ca^{+2} ATPaz aktivitelerinin kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde inhibisyona uğradıkları rapor edilmiş ve araştırmacılar, Mg^{+2} ATPaz

aktivitesinde meydana gelen önemli azalışı, pestisit maruziyetinin neden olduğu oksidatif fosforilasyonun inhibisyonuna bağlı olarak artan O₂ alınımı ve ATP azalışına bağlamışlardır. Ca²⁺ ATPaz inhibisyonunu ise pestisit toksisitesi sonucu oluşabilecek oksijen radikallerinden ya da doku hasarından dolayı hücre içi sitozolik Ca²⁺'nin artması ile ilişkilendirmişlerdir. ATPaz aktivite inhibisyonlarının iribaşların canlılıklarını devam ettirebilmek için hipometabolik durum sırasında enerji ekonomisine girmesi şeklinde açıklayabiliriz (Balasundaram vd., 1995).



Şekil 5.4. 96 saatlik TFS, THI ve TFS+THI karışım uygulamaları ile 24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının Na⁺/K⁺ ATPaz (A) ve toplam ATPaz (B) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.



Şekil 5.5. 96 saatlik TFS, THI ve TFS+THI karışım uygulamaları ile 24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının Mg²⁺ ATPaz (A) ve Ca²⁺ ATPaz (B) enzim aktiviteleri üzerine etkileri.

Çalışmada kullandığımız thiakloprid neonikotinoid bir insektisit olarak nikotinic asetilkolin reseptörleri (nAChR) için agonistik etkiye sahiptir (Aydın, 2011). Sentetik organik pestisitlerin yeni bir sınıfı olan neonikotinoitler geniş spektrumlu insektisitlerdir. Neonikotinoitlerle yapılan çalışmalarda böceklerdeki nAChR için memelilere göre daha seçici oldukları tespit edilmiştir (Schulz-Jander vd., 2002). Fakat Ford ve Casida (2006), farelerde yaptıkları çalışmada 20 mg/kg neonikotinoid insektisit olan thiamethoxamın sistemik uygulaması sonucunda %44'ünün metabolize edildiğini ve beyinde temel metabolitlerin tespit edildiğini rapor etmişlerdir.

Araştırma sonuçlarımıza göre, 96 saat süreyle THI'nın letal ve subletal konsantrasyonlarına (LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/10, LC₅₀/20, LC₅₀/50, LC₅₀/100) maruz kalan *X.laervis* iribaşlarında ALT, AST ve LDH enzim aktivitesinin istatistiksel olarak önemli düzeyde arttığı görülmektedir (p<0.05) (Şekil 5.1. A, B ve C). Özellikle doku hasarının belirlenmesinde biyobelirteç olarak kullanılan bu metabolizma enzimlerindeki artışlar, literatürdeki farklı neonikotinoid insektisit ve türlerle yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ile de benzerlik göstermektedir. Zaahkook vd. (2009) tarafından yapılan çalışmada, neonikotinoid insektisit imdacloprid (IMI)'e 3 ve 6 hafta süreyle maruz bırakılan Japon bildircinlarının kan serumu ve dokularında ALT, AST ve LDH aktivitelerinde artış görülmüştür. Kumar vd. (2010), neonikotinoid insektisit thiamethoxamın subletal konsantrasyonlarına 24, 48, 72 ve 96 saat boyunca maruz bırakılan tatlı su balığı *Channa punctatus*'un karaciğer, beyin, solungaç, kas ve böbrek dokularında ALT ve AST aktivitesinde artış olduğunu göstermiştir. Thiametoksamın etkisi nedeniyle gerçekleşen membran yıkımına bağlı doku tahribatının bir sonucu olarak transaminaz faaliyetlerinin proteolitik aktiviteler sonucu artabileceği ve transaminazlardaki bu değişimlerin enerji üretimi için balıklar tarafından amino asit havuzundaki serbest amino asitlerin kullanılmasından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Transaminaz enzimlerin protein ile karbonhidrat metabolizması arasında bir bağlantı olarak işlev gördüğü bilinmektedir. Pestisitlere (ör. karbamat) maruz kalan balıklarda, stres nedeniyle karşılaşılan enerji ihtiyacının artması sonucu, glukoneogenezisin indüklendiği ve stres koşullarına adaptasyonu sağlamak amacıyla karaciğer, beyin ve kas dokularındaki transaminaz aktivitesinin arttığı bildirilmiştir (Ramaswamy vd., 1999). LDH aktivitesindeki artış ise THI'nın neden olabileceği doku tahribatının bir sonucu

olarak solunum metabolizmasının aerobikten aneorobiğe dönüşmesi ve mitokondride oksidatif fosforilasyonu engellenmesi nedeniyle oluşan ATP açığının giderilmesi amacıyla artan glikoliz oranı ile ilişkilendirilebilir.

Çalışmamızda metabolik enzimler olan LDH, AST ve ALT'nin THI uygulamalarından diğer enzimlere oranla daha az etkilendiği görülmektedir. Ayrıca çalışmamızda THI'nın LC₅₀/10, LC₅₀/20 ve LC₅₀/100 konsantrasyonlarına maruz kalan iribaşlarda istatistiksel olarak anlamlı görülen ALT aktivitesindeki inhibisyonlar, düşük konsantrasyonlardaki THI maruziyetine bağlı olarak nükleer yapı, mitokondri ve düz endoplazmik retikulumda oluşabilecek bozulmalar sonucu transaminasyon işlemlerindeki gerilemeyle ilişkilendirilebilir (Aydin-Sinan vd., 2012; Malbrouck vd., 2003).

96 saat süreyle THI'nın letal ve subletal konsantrasyonlarına (LC₅₀, LC₅₀/2, LC₅₀/10, LC₅₀/20, LC₅₀/50, LC₅₀/100) maruz kalan *X. laevis* iribaşlarında, GST, AChE ve CaE aktivitelerinde, konsantrasyonla ilişkili olmayan değişimler gözlenmiştir (Şekil 5.2. A, B ve C). Ksenobiyotik metabolizmasında yer alan GST'nin, ksenobiyotiklere maruz kalmanın bir biyobelirteci olarak kullanılabileceği, birçok laboratuvar ve arazi çalışmasında gösterilmiştir. Çalışmamızda GST aktivitesinde, LC₅₀/2 THI konsantrasyonuna kadar olan gruplarda, konsantrasyonla ilişkili olmayan inhibisyon görülürken, en yüksek THI konsantrasyonunda ise artış gözlemlendi (p<0.05) (Şekil 5.2. A). GST aktivitesinin artışı, kirleticilerin yarattığı strese organizmanın gösterdiği adaptasyon olarak değerlendirilmektedir (Skouras vd., 2003). Ancak kirleticilerin GST indüksiyonuna neden olduğu iddiası kesin bir durum değildir. Kimyasala maruz kalma sonucu enzim aktivitesinin değişmediği veya aktivitenin inhibe olduğu çalışmalar da bildirilmiştir. Birkaç çalışmada alabalık, *Dicentrarchus labrax*, *Diplodus annularis*, *Lepomis macrochirus* türlerinde PCDD, pestisitler veya PAH'lara maruz kalmanın GST aktivitesinde azalmaya neden olduğu gösterilmiştir (Van Der Oost vd., 2003). Aydin (2011) tarafından yapılan bir çalışmada, thiaklopridin akut ve subakut etkisinde, GST aktivitesinin, yalnız sıçan timus dokusunda azaldığı belirlenmiş ve antioksidan savunmanın bu pestisidin metabolizması sırasında üretilen oksidatif moleküller nedeniyle zayıflamış olabileceği bildirilmiştir.

Asetilkolinesteraz (AChE) aktivitesi, sucul ve karasal ekosistemlerde insektisit kirliliğinin ölçümünde yüksek özgüllüğe sahip bir biyobelirteçtir. Çalışmamızda AChE aktivitesinde konsantrasyonla ilişkili olmayan değişimler gözlenmiştir. Qi vd. (2013) yapılan bir çalışmada, *Daphnia magna*'nın bir neonikotinoid insektisit olan guadipirine 48 saatlik maruziyeti sonucunda, AChE ve GST aktivitesinin önemli bir ölçüde arttığı gözlenmiş ve bu sonuçlar ışığında guadipirinin dafnialar için kısmen toksik olduğu bildirilmiştir. Neonikotinoid bir insektisit olan asetamipridin ticari formülasyonu mospilan'ın çevresel derişimlerine maruz bırakılan tatlı su midyesi *Anadonta cygnea*'nın sindirim kanalı ve solungaç dokusunda AChE aktivitesinde bir değişime neden olmadığı saptanmıştır (Mishchuk ve Stolyar 2008). AChE inhibisyonunun, OP, karbamat ve piretroit insektisitlere maruz kalan organizmalarda spesifik bir biyobelirteç olduğu rapor edilmiştir. Ancak bizim çalışmamızda AChE aktivitesi artan dozla birlikte inhibe olmamış ve LC_{50/50}, LC_{50/2} ve LC₅₀ dozlarında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli düzeyde aktive olmuştur (p<0.05) (Şekil 5.2. C). Bu yüzden, THI insektisitine kısa süreli maruz bırakmanın, *X. laevis*'de bu çalışmada kullanılan şartlar altında AChE aktivitesini inhibe etmeyebileceği söylenebilir. Benzer olarak, IMI insektisitinin *Mytilus galloprovincialis* midye türünde neden olduğu toksisiteye ait biyokimyasal değişimlerin değerlendirildiği diğer bir çalışmada, AChE aktivitesinin solungaç dokusunda azaldığı, neonikotinoid thiakloprid etkisinde ya da her ikisinin kombinasyonunda ise aktivitenin arttığı belirlenmiştir. Buna göre AChE'lerin neonikotinoidlere yanıtının türe-özgü olduğu belirtilmiştir (Dondero vd. 2010).

THI maruziyeti sonucu görülen AChE aktivitesindeki artış, postsinaptik nAChR agonisti olan THI'nin bu reseptöre bağlanması sonucu, kolinerjik sinapslarda artan ACh'nin bozulan dengenin tekrar sağlanması amacıyla asetik asit ve koline parçalanması şeklinde yorumlanabilir. Badiou ve Belzunces (2008) tarafından AChE aktivitesindeki artış ile ilgili iki görüş ileri sürülmektedir. Bunlardan birincisi, pestisit toksisitesine bağlı olarak salınımı artan ACh'in AChE aktivitesini indüklemesi şeklindedir. İkinci görüş ise, yine pestisit toksisitesi sonucu hücrel membran yüzeyinden ayrılan AChE'in yeniden yerinin doldurulması için enzimin *de novo* sentezinde meydana gelen artış şeklinde açıklanmıştır.

CaE'ler, ekolojik risk değerlendirme çalışmalarında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. (Barron vd., 1999; Cashman vd., 1996). Çalışmamızda, CaE aktivitesinde, bütün THI konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre konsantrasyonla ilintili olmayan ve kontrol grubuna göre istatistiksel anlamda önemli inhibisyonlar gözlemlendi ($p < 0.05$) (Şekil 5.2. B). *Xenopus* iribaşlarının piretroit insektisilerden Lamda Sihalotrine 24 saat boyunca maruz kaldığı laboratuvar çalışmasında, CaE aktivitesinin %27.4 ($p < 0.001$) düzeyinde inhibisyon uğraması (Aydın-Sinan vd., 2012); Robles-Mendoza vd. (2012) tarafından yapılan laboratuvar çalışmasında, Klorpirifos'a maruz bırakılan *Ambystoma mexicanum* türü semenderde CaE aktivitesinin yaklaşık %50 ($p < 0.05$) düzeyinde inhibisyona uğraması; Güngördü vd. (2013b) tarafından yapılan bir çalışmada, yeni sentez edilmiş benzimidazol kökenli sekiz organofosfor (OP) bileşiğin 46. evredeki *X. laevis* iribaşlarında *in vivo* uygulama koşullarında, belirlenen dozlara maruz bırakılan iribaşlarda, AZM ve test edilen sekiz OP bileşikten yedisinin CaE inhibisyonuna neden olması çalışmamızla paralellik göstermektedir. CaE enziminde genel olarak görülen aktivite kaybının, iribaşların ölüm periyoduna girmeleri nedeniyle protein sentezinin baskılanmasının bir sonucu olarak meydana geldiği düşünülebilir. CaE aktivitesinin ölçülmesi, tarımsal kimyasalların ekosistem üzerindeki etkilerinin önceden belirlenmesi için kullanılışlı bir araç sağlamaktadır (Wheelock vd., 2005). Ayrıca, THI maruziyeti sonucu AChE aktivitesindeki görülen artış ile CaE aktivitesindeki azalış, daha önce bahsedildiği gibi CaE enziminin AChE için koruyucu rol oynamasını destekler niteliktedir.

Oksidatif stres varlığını ve derecesini ortaya koymak için 96 saat süresince belirlenen THI konsantrasyonlarına maruz bırakılan *Xenopus laevis* iribaşlarında GR, CAT ve GPx aktivitelerindeki değişimler değerlendirildiğinde, GR aktivitesinde, THI konsantrasyonları ile paralel olmayan artışlar görüldü ve kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli bulundu ($p < 0.05$) (Şekil 5.3. A). Hücre bileşenlerinin ROS bileşiklerine maruz kalmaları sonucu oluşan oksidatif hasar, artan antioksidan enzim aktivitesi (GPx, GST, GR ve CAT gibi) ile engellenir. Balıklar maruz kaldıkları oksidatif stres koşullarına uyum sağlama eğilimindedirler. Bu nedenle kirlenmiş su sistemlerinde yüksek peroksidatif bileşikler, bu alanlarda bulunan balıklarda GR aktivitesinin artmasına yol açmaktadır. Değişik araştırmacılar tarafından yapılan çok sayıda çalışmada, peroksidatif bileşiklerin yüksek oranda

bulunduğu kirli sucul alanlarda yaşayan balıklarda yüksek GR aktivitesi belirlenmiştir (Pandey vd., 2003; Stephensen vd., 2002). Ferrari vd. (2011) tarafından yapılan laboratuvar çalışmasında, organofosfat türü bir pestisit olan Azinfos metil ve karbamat türü bir pestisit olan Karbaril, *Rhinella (Bufo) arenarum* iribaşlarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında GR aktivitesini sırasıyla % 23 ve % 32 düzeyinde indüklemiştir. Poliklorlu bifenile (PCB)'e maruz bırakılmış alabalıklarda GR aktivitesinin kontrol grubuna göre >%500 düzeyinde artış gösterdiği saptanmıştır (Van Der Oost vd., 2003).

CAT aktivitesinde, THI konsantrasyonları ile paralel olmayan inhibisyon görüldü ve kontrol grubuyla kıyaslandığında, istatistiksel olarak önemli bulundu ($p<0.05$) (Şekil 5.3. B). Çalışmamızla benzer olarak, *Rhinella arenarum* iribaşları üzerine azinfos metil (AZM) ve karbarilin (CB) etkilerinin incelendiği bir çalışmada, iribaşlar 48 saat boyunca 3 ve 6 mg/L AZM, 10 ve 20 mg/L CB'ye maruz bırakılmış ve CAT aktivitesi her iki pestisit tarafından önemli ölçüde inhibe edilmiştir (Ferrari vd., 2011). Atrazin (ATR) ve Klorpirifos'a (CPF) 40 gün boyunca karışım ve birebir uygulamaları sonucunda, karaciğer ve solungaç dokularında doza bağımlı bir şekilde antioksidan enzim aktivitelerinin (SOD, CAT ve GPx) azaldığı belirtilmiştir (Xing vd., 2012). CAT aktivitesindeki düşüş, pestisit uygulamasıyla indüklenen reaktif oksijen türlerindeki artış ve bu reaktif oksidanların enzim sentezinde görev yapan genlerin ifadelerindeki baskılanma ile enzimin aktivasyonunun engellenmesi ya da sentezlenen enzimlerin yapılarındaki oksidasyonla açıklanabilir.

GPx aktivitesinde, bütün THI konsantrasyonlarında kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli artışlar gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 5.3. C). GPx, çevresel kirliliğin canlılarda neden olduğu oksidatif hasarın belirlenmesinde biyokimyasal bir parametre olarak sıklıkla kullanılmaktadır. Özellikle antioksidan savunma sisteminin bir elemanı olan bu enzimdeki artışlar, literatürdeki farklı türlerle yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ile de benzerlik göstermektedir. Örneğin, bir herbisit olan 2,4-D ile bir insektisit olan azinfosmetile maruz bırakılmış *Oreochromis niloticus* balık türünün karaciğer GPx aktivitesinde artış görülmüştür (Oruç ve Üner, 2000). Bir tatlı su balığı olan *Channa punctatus*'un poliklorlu hidrokarbon olan endosülfana 24 saatlik maruziyeti sonucu GPx aktivitesinin arttığı ($p<0.05-0.001$) belirlenmiştir (Pandey vd., 2001). Yapılan başka bir çalışmada ise *O. niloticus*'un

karaciğer ve böbrek dokularındaki GR, GST ve GPx aktivitesinin kirlenmiş bölgelerdeki balıklarda kontrol grubu balıklarına oranla daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Hamed, 2003). GPx aktivitesindeki artış, serbest radikal üretiminin, detoksifikasyon mekanizma kapasitesinin üstünde olması ile yorumlanabilir.

Osmoregülasyon metabolizmasındaki toksisitenin belirlenmesi amacıyla parametre olarak kullanılan ATPaz enzim aktivitelerinin, seçilen THI konsantrasyonlarına 96 saat boyunca maruz kalan *Xenopus laevis* iribaşlarındaki değişimleri incelendiğinde, Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinin kontrol grubuna göre arttığı, toplam ATPaz, Mg^{+2} ATPaz ve Ca^{+2} ATPaz aktivitelerinin ise inhibisyona uğradığı ve tüm bu değişimlerin kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak önemli olduğu saptanmıştır ($p < 0.05$) (Şekil 5.4. A ve B; Şekil 5.5. A ve B). Ca^{+2} -ATPaz, Ca^{+2} metabolizmasındaki önemi ve yapısındaki fonksiyonel -SH gruplarına bağlı olarak ağır metal etkisinde inhibe olması ile kirlilik çalışmalarında büyük önem kazanmaktadır (Wong ve Wong, 2000). Mg^{+2} -ATPaz enziminin oksidatif fosforilasyon ve iyon taşınmasında önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir. Bununla birlikte Mg^{+2} -ATPaz enzimi, balıklarda solungaç epitelyumundan hücre membran bütünlüğü ve geçirgenliğinin stabilizasyonu için gerekli olan Mg^{+2} 'nin taşınmasında görev görmektedir ve Mg^{+2} -ATPaz inhibisyonu, oksidatif fosforilasyonu etkilemektedir (Parvez vd., 2006).

Yapılan literatür araştırmalarında, Atlı ve Canlı (2011a) tarafından yapılan bir çalışmada, tatlısu balığı *Oreochromis niloticus*, farklı derişimlerdeki Cu^{+2} , Cd^{+2} , Cr^{+6} , Ag^{+} ve Zn^{+2} 'ye akut ve kronik olarak maruz bırakılmış ve solungaç, böbrek ve kas dokularında Na^+/K^+ -ATPaz, Mg^{+2} -ATPaz, toplam-ATPaz, Ca^{+2} -ATPaz enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Buna göre, akut ve kronik uygulamalar ile *in vivo* ve *in vitro* koşullarda, metallerin Na^+/K^+ -ATPaz ile Ca^{+2} -ATPaz aktivitesini azalttığı, toplam-ATPaz ile Mg^{+2} -ATPaz aktivitesinde ise azalış yanında artışa da neden olduğu gösterilmiştir. İyon akışının düzenlenmesi, iyonik ve osmotik homeostazisin dengelenmesi ile ilişkilidir. Sucul organizmalar dikkate alındığında, Na^+/K^+ -ATPaz'ın iyon düzenlenmesinde yaşamsal bir öneme sahip olduğu bilinmektedir ve Na^+/K^+ -ATPaz aktivitesindeki olası değişikliklerin doğal stres kaynaklarında olduğu gibi çeşitli çevresel kirleticilere tepki olarak geliştiği gözlenmiştir (Bianchini ve Wood, 2003; Bianchini vd., 2004, 2005).

Eroğlu ve Canlı (2013) tarafından yapılan bir çalışmada, 1 µg/mL derişimindeki Cd⁺² ve Zn⁺²'in ayrı ayrı ve birlikte etkilerine farklı sürelerde (0, 7, 14, 21 ve 28 gün) maruz kalan tatlısu balığı *Oreochromis niloticus*'un farklı dokularında Na⁺/K⁺-ATPaz ve Ca⁺²-ATPaz, aktiviteleri metal türü, metallerin ayrı ayrı ve birlikte etkileri, etki süresi ve doku tipine bağlı olarak genellikle azalış yönünde bir değişim gösterirken, Mg⁺²-ATPaz aktivitelerinde anlamlı bir değişiklik görülmemiştir. Üner vd. (2005), yeni bir organoflorin akarisit-insektisit olan etoksazol maruz bırakılan tatlısu balığı *Oreochromis niloticus*'un solungaç ve kas dokularında, Na⁺/K⁺-ATPaz aktivitesinde artış, Ca⁺²-ATPaz ve Mg⁺²-ATPaz aktivitelerinde ise önemli bir değişim olmadığını gözlemlemişlerdir (Üner ve Sevgiler, 2005).

Bu sonuçlar ışıkında, enzim aktivitesinde gerçekleşen azalışlar, THI'nın akut etkisine bağlı olarak, epitelyal taşınmanın fonksiyonel ve morfolojik bütünlüğünün bozulması ve hücre zarında oluşan yapısal hasarın sonucunda zar geçirgenliğinin değişmesinden kaynaklanabilmektedir. Enzim aktivitesindeki artışlar ise bozulan düzenin tekrar onarılabilmesi için antioksidan sistemler gibi olası telafi mekanizmaları ile açıklanabilmektedir.

Çalışmamızda THI ve TFS karışımlarının biyokimyasal belirteçler üzerine etkileri değerlendirilirken, 96 ve 24 saatlik çalışmalar ile ilgili bulgular birlikte ele alınmıştır.

Bu alışmada, TFS ve THI'nın ikili kombinasyonlarında, 96 saat süreyle LC₅₀ karışımlarına maruz kalan iribaşların hepsinin öldüğü görülmektedir. Bu da pestisitlerin LC₅₀ karışımının öldürücü etki düzeyinin, tek başlarına pestisitlerin belirtilen konsantrasyonlarının öldürücü etki düzeylerinden yüksek olduğunun bir göstergesidir.

Ksenobiyotikler ile ilgili çalışmaların büyük çoğunluğunda bu kimyasalların tek olarak kullanıldıklarında ne tür etkilerin ortaya çıkacağı araştırılmıştır. Fakat kirli ekosistemlerde canlılar bir tek kimyasal yerine çok çeşitli toksik maddelere birlikte maruz kalmaktadırlar. Bu kirleticiler arasında maruz kalan canlıdaki toksik tepkiyi arttıran veya azaltan (durduran) bir ilişki vardır. Etkileşim, kinetik fazda canlı tarafından toksik maddenin alınımını, dağılımını, depolanmasını ve metabolizmasını

değiştirerek ya da dinamik fazda, toksik madde-reseptör bağlanma aktivitesi ve çekimini değiştirerek kimyasal ya da fiziksel olabilir.

Çoklu toksisite oluşturan etkileşim mekanizmaları Anderson ve D' Apolonia (1978) tarafından aşağıdaki şekilde ifade edilmiştir: Öncelikle toksik kimyasal, çevresel ortamda bulunan diğer kimyasallar ile etkileşerek yeni bileşikler, şelatlar, kompleksler oluşturur veya kimyasal durumu değiştirir. Özetle kirletici maddeler ve diğer substratlar arası etkileşim, kirleticinin fizikokimyasal yapısını ve toksik olma durumunu değiştirir. Canlıya geçişte çoklu kirleticiler aynı hedef organda aynı bölgeyi etkileyebilir veya farklı hedef dokularda farklı bölgeleri etkileyebilir ve bu şekilde yaygın olumsuz tepki ortaya çıkar. Bir kirletici toksik madde olarak normalde inaktif olduğu halde diğer maddeler ile birlikte etkisi değişebilir ve çoklu kirleticilerde kimyasalların tek tek oluşturdukları toksik etki bir arada olduklarında değişebilir. Kinetik fazda ise, çoklu kirleticiler içindeki maddelerin hedef doku tarafından alınması farklılık gösterebilir. Çoklu kirleticilerde bulunan maddeler orijinal maddelere göre metabolitlerin üretimini artırır veya azaltır' (Parlak, 2009).

96 saat süreyle TFS+THI karışımının uygulandığı bütün gruplarda ALT, AST ve LDH enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak önemli artışlar gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 5.1 A, B, C). Bu artışlar, TFS ve THI'nın subletal konsantrasyonlarına tek başına maruz kaldıklarında iribaşlarda görülen aktivasyonlara göre daha yüksek oranda artış göstermişlerdir. 96 saatlik uygulamalar sonucunda tek başına TFS, ALT aktivitesinde en yüksek %23 oranında artışa; AST aktivitesinde en yüksek %12 düzeyinde inhibisyona; LDH aktivitesinde ise en yüksek % 36 oranında artışa neden olurken, tek başına THI uygulaması, ALT, AST ve LDH aktivitelerinde sırasıyla en yüksek % 15, % 25 ve % 19 oranında artışa neden olmuştur ($p<0.05$). 96 saatlik TFS+THI kombinasyon uygulaması sonucunda ise ALT aktivitesinde en yüksek % 36 (additif etki); AST aktivitesinde en yüksek % 37 (sinerjistik etki); LDH aktivitesinde ise % 59 (additif etki) oranında artış görülmüştür ($p<0.05$). Bu durum pestisitlerin tek başına uygulamalarında görülen artış oranından çok daha yüksek olduğunu göstermektedir. Bu da pestisitlerin tek başına oluşturdukları etkilere göre karışım halinde bulduklarında çok daha toksik olduklarının bir göstergesi olarak düşünülebilir. Buna karşın, 24 saat süreyle TFS+THI karışımının uygulandığı gruplarda ise ALT, AST ve LDH aktivitelerinde

en yüksek dozlarda istatistiksel anlamda önemli inhibisyonlar gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 5.1 A, B, C). 24 saat süreyle TFS+THI karışımına maruz kalan iribaşlarda enzim aktivitelerindeki inhibisyonun nedeni, bu karışıma maruziyetten dolayı iribaş metabolizmasında transaminasyon, fosforilasyon ve anaerobik solunum süreçlerinde bozulma olması gösterilebilir. Aydın-Sinan ve arkadaşları (2012) tarafından, *Xenopus laevis* iribaşları üzerine deltamethrin ve λ -cyhalothrinin 168 saatlik maruzatının toksik etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, 24 saat uygulama sonucunda LDH aktivitesinde kontrol grubuna göre önemli inhibisyon gözlenmesi, çalışmamızla paralellik göstermektedir. ALT, AST ve LDH enzim aktivitelerinde görülen değişimler tek başına TFS uygulamasından çok THI uygulamasına benzediğini ve verilerimiz doğrultusunda *X. laevis* iribaşları için TFS'nin THI ile birlikte uygulamasının, THI'ya olan duyarlılığı ve toksik etkiyi artırdığını söyleyebiliriz.

96 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının GST, CaE ve AChE enzim aktiviteleri üzerine etkisine bakıldığında, GST ve AChE aktivitelerinde kontrol grubuna göre önemli artışlar, CaE aktivitesinde ise inhibisyon gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 5.2. A, B, C). 24 saatlik karışım uygulanmasında da aynı sonuçlar görüldü. Tek başına THI'nın 96 saatlik uygulamalarında, GST aktivitesinde en yüksek %17 düzeyinde artış; CaE aktivitelerinde en yüksek % 21 oranında inhibisyon, AChE aktivitesinde ise en yüksek % 14 düzeyinde artış görülürken, tek başına TFS'ye maruz kalma sonucunda GST aktivitesinde en yüksek % 43 oranında artış, CaE ve AChE enzim aktivitelerinde ise sırasıyla en yüksek % 23 ve % 37 oranında inhibisyon gözlemlendi ($p<0.05$). 96 saatlik TFS+THI karışım uygulamasının sonucunda, GST ve AChE aktivitesinde sırasıyla en yüksek % 64 (additif etki) ve % 15 (sinerjistik etki) oranında artış görülürken, CaE aktivitesinde en yüksek % 22 oranında inhibisyon görülmüştür ($p<0.05$).

GST ve AChE aktivitelerini tek tek uygulanmalarından daha fazla artırmasının sebebi, kimyasal maddelerin birlikte kullanıldığında birbirlerinin etkisini arttırması anlamına gelen additif ve sinerjistik etkileşimle açıklanabilir (Güven, 1999). TFS+THI karışım uygulamasının GST aktivitesini arttırması, tek başına THI etkisine karşı; AChE aktivitesini artırması ise, TFS etkisine karşı verilen bir detoksifikasyon yanıtı olarak değerlendirilebilir. Oruç vd. (2004), yaptıkları

çalışmada karaciğer dokusunda 2,4-D ve azinfosmetilin kombine etkisinin kontrole oranla GST aktivitesini önemli düzeyde indüklediğini tespit etmişlerdir. Bu sonuç, yaptığımız çalışmada TFS'nin THI ile birlikte kullanıldığında oluşan GST cevabı ile benzerdir. GST aktivitesindeki indüklenmenin nedeninin, enziminin pestisit toksisitesine karşı daha iyi bir cevap oluşturması olarak değerlendirilebilir. Bununla birlikte, GST aktivitesindeki artış, bu pestisit konsantrasyonlarına devamlı maruz kalma sonucu iribaşların metabolik adaptasyonu ile de ilişkilendirilebilir. Örneğin, tarımda yabancı otların kontrolü için kullanılan parakuat herbisitine maruz bırakılan *Oreochromis niloticus* balık türünde GST aktivitesinin arttığı (Figueiredo-Fernandes vd., 2006), benzer şekilde PAH ve PCB gibi kirleticilerin GST aktivitesini indüklediği bilinmektedir (Machala vd., 1998; Shailaja ve D'Silva, 2003; Bello vd., 2001). El-Gendy (1990) ve Singh vd. (2006) yaptıkları çalışmalarda, ditiyokarb, sipermetrin, dimetoat ve klorpirifos pestisitlerinin GST aktivitesinde önemli bir artış yarattığını rapor etmişlerdir. Barden (2001) da erkek sıçanların, THI'nın P20 mg/kg bw/gün dozuna iki hafta maruz kalması sonucu, karaciğerlerinde Faz I ve Faz II enzim aktivitelerinin arttığını rapor etmişlerdir (Aydın, 2011).

Tek başına THI, AChE aktivitesinde artışa, tek başına TFS ise inhibisyona neden olurken, bu pestisitlerin karışımı aktivasyona neden olmuştur. Verilerimiz doğrultusunda GST, CaE ve AChE enzim aktivitelerinde görülen değişimlerin tek başına TFS uygulamasından çok THI uygulamasına benzediğini ve *X. laevis* iribaşları için TFS'nin THI ile birlikte uygulamasının, THI'ya olan duyarlılığı ve toksik etkiyi artırdığını söyleyebiliriz. Malev vd. (2012), neonikotinoidlerin, nikotinik asetilkolin reseptörlerinin (nAChRs) agonisti olmalarına rağmen, AChE aktivitesini direkt olarak inhibe etmediğini rapor etmişlerdir. CaE enzim aktivitesinde pestisitlerin tek tek ve kombine halde uygulanması sonucu tüm gruplarda inhibisyona uğramasının sebebi, iribaşların ölüm periyoduna girmeleri nedeniyle protein sentezinin baskılanmasının bir sonucu olarak meydana geldiği düşünülebilir.

Yapılan çalışmalarda, balıkların karaciğer CaE aktivitesinin OP bileşiklerce AChE'den daha yüksek affinite ile fosforillendiği, böylece detoksifikasyonda önemli bir rol aldığı rapor edilmiştir. Örneğin, Ru vd. (2003) tarafından yapılan bir çalışmada, bir OP bileşik olan monokrotofos'un subletal konsantrasyonlarına maruz

bırakılan *Sciaenops ocellatus*'un beyin AChE ve karaciğer CaE aktivitesinde önemli derecede azalış belirlenmiştir. Ancak inhibisyon oranlarına bakıldığında, CaE inhibisyonunun daha yüksek olduğu ve bunun AChE inhibisyonunu azalttığı ileri sürülmüştür. Çalışmamızda da AChE aktivitesinin artışı ile CaE aktivitesinin azalması bu çalışmayla benzerlik göstermektedir.

İribaşlarda TFS ve THI karışımı uygulamasına bağlı olarak 96 saat süreyle pestisit konsantrasyonlarının karışımına maruz kalma sonucunda GR, CAT ve GPx enzim aktivitelerinde sırasıyla en yüksek % 30, % 61 ve % 79 oranında kontrole göre önemli artışlar gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 5.3. A, B, C). Tek başına THI'nın 96 saatlik uygulamalarında, GR aktivitesinde en yüksek %17 düzeyinde artış; CAT aktivitesinde en yüksek % 31 oranında inhibisyon, GPx aktivitesinde ise en yüksek % 128 düzeyinde aktivasyon görülürken, 96 saat süreyle tek başına TFS'ye maruz kalma sonucunda GR aktivitesinde kontrole göre önemli bir değişim görülmezken, CAT ve GPx enzim aktivitelerinde sırasıyla % 65 ve % 104 oranında artış gözlemlendi ($p<0.05$). 24 saatlik TFS+THI karışım uygulamalarında, kontrol grubuna göre GR, CAT ve GPx aktivitelerinde sırasıyla en yüksek % 41, %56 ve % 49 oranında olmak üzere önemli inhibisyonlar gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 5.3. A, B, C). Özellikle antioksidan savunma sisteminin elemanları olan bu enzimlerdeki artışlar, literatürdeki farklı türlerle yapılan çalışmalardan elde edilen veriler ile de benzerlik göstermektedir. Yapılan bir çalışmada, *O. niloticus*'un karaciğer ve böbrek dokularındaki GR, GST ve GPx aktivitesinin kirlenmiş bölgelerdeki balıklarda, kontrol grubu balıklarına oranla daha yüksek olduğu rapor edilmiştir (Hamed vd., 2003). Yaptığımız çalışmada tek başına TFS uygulamasında GR aktivitesinde kontrole göre önemli bir değişim görülmezken, tek başına THI uygulamasının GR aktivitesini arttırdığı gözlemlenmiştir. 24 saatlik TFS+THI karışım uygulamasına bağlı olarak, GR aktivitesinde inhibisyon görülürken, 96 saatlik karışımın GR aktivitesini önemli oranda arttırdığı saptandı ($p<0.05$) (Şekil 5.3. A). Buna göre, TFS+THI karışımına maruz kalan canlılardaki GR enzim seviyesinin zamana bağlı olarak artış gösterdiği saptandı ($p<0.05$) (Şekil 5.3. A). Bu da, enzimlerin akut ve subakut maruziyette farklı yanıtlar vermesinin bir sonucu olarak meydana geldiği ve GR aktivitesinin baskılanması sonucu serbest radikallerin birikimi nedeniyle bir toksik hasarın ortaya çıkabileceğini düşündürmektedir. Buna göre tek tek THI ve TFS'ye maruz kalan iribaşlara göre kombine etkiye maruz kalan canlılarda 96. saatte GR

aktivitesinde önemli düzeyde sinerjistik bir etki tespit edildi ($p<0.05$). Bu sonuçlar doğrultusunda, GR enzim aktivitelerinde görülen değişimlerin, tek başına TFS uygulamasından daha çok THI uygulamasına benzediğini ve *X. laevis* iribaşları için THI'nın TFS ile birlikte uygulanmasının, THI'ya olan duyarlılığı ve toksik etkiyi arttırdığı söylenebilir. Çalışmamıza benzer olarak, Oruç ve Üner (2000) yaptıkları çalışmada, 2,4-D ve azinfosmetilin kombine etkisine maruz kalan canlıların, kontrole göre GR aktivitesinde kontrolle karşılaştırıldığında, önemli düzeyde artış rapor etmişlerdir.

Yaptığımız çalışmada, GPx aktivitesinde ise 96 saatlik kombine pestisit uygulaması sonucunda ayrı kullanımlara oranla bir azalma yani birbirlerinin etkilerini azaltıcı antagonistik etki gözlenmiştir. GR aktivitesi ve GST aktivitesi arasında pozitif bir korelasyon saptanmıştır. GST aktivitesinin pestisit, ağır metaller veya farklı ksenobiyotikler gibi her türlü stres koşullarından etkilendiği bilinmektedir. GST, reaktif bir elektrofilik merkeze sahip çeşitli ksenobiyotikleri glutatyonun thiol grubu ile konjugasyonunu katalizleyen bir enzimdir. GST enzimi bu reaksiyonları katalizlerken GSH da GSSG'ye dönüşmektedir. Stres altındaki bir canlıda ya da hücrede GR aktivitesinin yüksek olması, GR'nin GSSG'yi GSH'a dönüştüren bir enzim olmasıyla ilişkilendirilebilir.

CAT enziminde tek başına THI'nın 96 saatlik uygulamalarında, kontrole göre önemli oranda inhibisyon, tek başına TFS'ye maruz kalma sonucunda artış, 24 saat bu pestisitlerin kombinasyonlarına maruz kalma sonucunda inhibisyon ve 96 saat kombinasyona maruz kalma sonucunda ise tekrar aktivasyon gözlenmesi, ksenobiyotik etkisine karşı verilen bir detoksifikasyon yanıtı olarak değerlendirilebilir. Buna göre tek tek THI ve TFS'ye maruz kalan canlılara göre kombine etkiye maruz kalan canlılarda 96. saatte CAT aktivitesinde önemli düzeyde sinerjistik bir etki tespit edildi ($p<0.05$). Bununla birlikte, TFS+THI karışımına maruz kalan canlılardaki CAT enzim seviyesinin zamana bağlı olarak artış gösterdiği saptandı ($p<0.05$) (Şekil 5.3. B). Pestisitlerin tek başlarına etkileri göz önünde bulundurulduğunda, TFS+THI karışımına maruz kalan iribaşlarda enzim aktivitelerinin kısmen daha fazla etkilendiği görülmektedir. CAT aktivitesinde görülen değişimlerin, tek başına THI uygulamasından daha çok TFS uygulamasına

benzediğini ve *X. laevis* iribaşları için THI'nın TFS ile birlikte uygulanmasının, TFS'ye olan duyarlılığı ve toksik etkiyi arttırdığını söyleyebiliriz.

96 saatlik THI ve TFS'nin GPx aktivitesi üzerinde tek başlarına oluşturdukları etkiler ile karışım halinde oluşturdukları etkiler aktivasyonun artışı yönünde benzer bir eğilim göstermekle birlikte ($p<0.05$), 24 saatlik karışım uygulamasında CAT aktivitesinde olduğu gibi inhibisyon göstermiştir (Şekil 5.3. B, C). Antioksidan enzimler olan CAT ve GPx aktivitelerinde zamana bağlı olarak önce inhibisyon, sonra aktivasyon gözlenmesinin sebebi, toksikantlara maruz kalma sonrası ilk yanıt olarak, diğer detoksifikasyon mekanizmalarının indüksiyonundan önce, serbest radikallerin etkisinden organizmayı korumak için antioksidan savunma sistemlerinin indüklenmesi ya da yeni enzim sentezleri için gen ifadelerinin artırılması şeklinde düşünülebilir (Rosenbaum vd., 2012; Kaufer vd., 1998). Demirci (2013) tarafından atrazin ve indoxacarbın tek ve kombine etkisine maruz kalan *G. kichneffensis* bireylerinde CAT aktivitesi incelendiğinde, 24. ve 48. saatlerde kombine etkinin CAT enzim aktivitesinde pestisitlerin, ayrı uygulandığı canlılardaki enzim aktivitesine göre önemli düzeyde indüklenmeye neden olduğu gözlenmiştir ($p<0.05$). Aynı çalışmada yine CAT enziminin atrazin+endosülfan kombinasyonuna maruz kalma sonucunda, her zaman diliminde kombine etkinin, sadece atrazinin LC₅₀/100'lük dozuna maruz kalan canlılardaki CAT enzim aktivitesine göre önemli düzeyde arttığı gözlenmiştir ($p<0.05$) ve bunun pestisitlerin birlikte kullanıldıklarında aditif veya sinerjistik etki göstermesi sonucuna varılmıştır.

96 saatlik uygulamalar sonucunda tek başına TFS, iribaşlarda Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesinde en yüksek %604 oranında artışa; toplam ATPaz, Mg⁺² ATPaz ve Ca⁺² ATPaz aktivitelerinde ise sırasıyla en yüksek %75, %41, % 36 düzeyinde inhibisyona neden olmuştur. Tek başına THI'nın 96 saatlik uygulaması, iribaşlarda Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesinde en yüksek %421 oranında artışa; toplam ATPaz, Mg⁺² ATPaz ve Ca⁺² ATPaz aktivitelerinde ise sırasıyla en yüksek %64, %29, %29 düzeyinde inhibisyona neden olmuştur. ($p<0.05$). 96 saatlik TFS+THI karışım uygulamasında, Na⁺/K⁺ ATPaz aktivitesinde kontrol grubuna göre en yüksek %344 oranında önemli artış olurken, toplam ATPaz, Mg⁺² ATPaz ve Ca⁺² ATPaz enzim aktivitelerinde kontrol grubuna göre sırasıyla %50, %33 ve %30 düzeyinde olmak üzere önemli inhibisyonlar olmuştur ($p<0.05$). 24 saatlik karışım uygulanmasında ise

toplam ATPaz aktivitesinde kontrol grubuna göre inhibisyon (en yüksek %60), Na^+/K^+ ATPaz, Mg^{+2} ATPaz ve Ca^{+2} ATPaz aktivitesinde ise kontrol grubuna göre sırasıyla en yüksek %327, %27 ve %35 oranında önemli artış gözlemlendi ($p<0.05$). Tek başına THI ve tek başına TFS'nin 96 saatlik uygulamalarında, TFS+THI karışımının 96 saatlik uygulamasında olduğu gibi, Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinde kontrol grubuna göre önemli artış, toplam ATPaz, Mg^{+2} ATPaz ve Ca^{+2} ATPaz enzim aktivitesinde ise kontrol grubuna göre önemli inhibisyonlar gözlemlendi ($p<0.05$) (Şekil 5.4. A, B; Şekil 5.5. A, B). Ancak, 96 saatlik karışım uygulamasında görülen bu değişimler, 96 saatlik THI ve TFS'nin tek başlarına uygulandıklarında Na^+/K^+ ATPaz aktivitesinde gösterdikleri aktivasyon ile toplam ATPaz, Mg^{+2} ATPaz ve Ca^{+2} ATPaz enzim aktivitesinde gösterdikleri inhibisyonlardan kısmen daha düşüktür. Bu sonuçlara göre, THI ve TFS'nin enzimler üzerinde tek başlarına oluşturdukları etkiler ile karışım halinde oluşturdukları etkiler, benzer bir eğilim göstermesine rağmen birbirlerinin etkilerini azaltmalarından dolayı kısmen antagonist etkiyi düşündürmektedir. Hazarika vd. (2003) OP pestisitler olan malatyon ve anilofos kombinasyonuna maruz bırakılan sıçanların kan, beyin ve karaciğerinde karaciğer ve eritrositlerde Na^+/K^+ ATPazın artış göstermesi, çalışmamızla paralellik göstermektedir.

Çalışmamızda pestisitlerin tek tek uygulanması ile kombinasyon halinde uygulanması arasındaki tek fark, 24 saat TFS+THI kombinasyonu uygulanması sonucunda Mg^{+2} ATPaz ve Ca^{+2} ATPaz aktivitesinde kontrole göre önemli artış gözlenmesidir ($p<0.05$) (Şekil 5.5. A, B). Bir başka ifade ile Mg^{+2} ATPaz ve Ca^{+2} ATPaz aktivitesinde zamana bağlı olarak inhibisyonlar gelişmiştir. 24 saatlik TFS+THI karışımının uygulanması sonucu meydana gelen aktivasyonun 96 saatlik uygulama sonucunda inhibe olması, enzimlerin akut ve subakut maruziyete bağlı olarak oluşan yanıtların farklı olması ve metabolik baskılanması sonucu serbest radikallerin birikimden kaynaklanabilir. Bununla birlikte, 24 saatlik TFS+THI karışımının uygulanması sonucu meydana gelen ATPaz enzim aktivitesindeki artışlar, akut süreçte ilk uygulanma anında pestisitlerin doza bağlı şiddetli etkileri nedeniyle hücrede bozulan dengenin tekrar onarılması için antioksidan, detoksifikasyon ya da metallothionein gibi olası telafi ve onarım mekanizmalarının devreye girmesi ve protein sentezinin artışı ile açıklanabilir. 96 saatlik TFS+THI karışım uygulaması sonucunda görülen ATPaz inhibisyonları, antioksidan ya da

detoksifikasyon sistemler gibi telafi sistemlerinin yetersiz kalması sonucu osmoregülasyon sisteminde meydana gelen bozulmalar veya hücre zarında oluşan yapısal hasarlar nedeniyle, hücrenin hipoksik koşullara kayması, oksidatif fosforilasyonun inhibisyonu ve oluşan ATP açığının giderilmesi için canlının enerji ekonomisine geçmesi şeklinde yorumlanabilir. Kakko ve arkadaşları tarafından (2000) yapılan bir çalışmada, piretrin ve piperonil butoksit karışımına maruz kalan sıçan beyinlerinin serebral sinaptozomlarında toplam ve Mg^{+2} -ATPaz aktivitelerinde, tek tek uygulanmalarına göre önemli inhibisyonlar görülmesi, çalışmamızla benzerlik göstermektedir.

Tez kapsamında, seçilen pestisitlerin (TFS ve THI) genotoksik etkilerinin olup olmadığını saptamak amacıyla mikronükleus ve komet analizi yapılmaya çalışılmıştır. Seçilen pestisitlerin 96 saatlik tek tek ve 1:1 ve karışım uygulamaları ile 24 saatlik 1:1 karışım uygulaması sonucunda, kimyasalların muhtemel toksik etkileri sebebiyle *Xenopus* iribaşlarının kalplerinde yeterli miktarda kan bulunmaması ve kanın büyük ölçüde baş kısmında toplanması ve/veya pıhtılaşması, iribaşlardan heparinli enjektörler (1 ml'lik insülin enjektörleri, 0.3x8 mm, Becton Dickinson) yardımıyla kan alınmasını zorlaştırmıştır. Elde edilen az miktardaki kan hücresinin yapısal bütünlüğe sahip olmaması ise deneylerin yürütülmesini ve genotoksisite ile ilgili yeterli verinin elde edilmesini olanaksız hale getirmiştir. Bu nedenle, genotoksisite çalışmaları tez kapsamından çıkarılmıştır.

Sonuç olarak, yaptığımız çalışmada TFS ve THI'nın *Xenopus laevis* için letal ve subletal konsantrasyonlarının, tek ve kombine kullanımlarının, ksenobiyotikler için biyobelirteç olan antioksidan enzimlerin (GR, CAT ve GPx), biyotransformasyon enzimi olan GST, esterazlar (AChE, CaE), metabolik enzimler (AST, ALT, LDH) ve ATPazlar (Na^{+}/K^{+} ATPaz, toplam ATPaz, Mg^{+2} ATPaz ve Ca^{+2} ATPaz) seviyelerinde istatistiksel olarak önemli değişikliklere yol açtığı tespit edilmiştir. Kullanılan yeni nesil pestisitler olarak adlandırılan TFS ve THI'nın *Xenopus laevis* gibi hedef olmayan organizmalar için düşük dozlarda bile toksik olabileceği belirlenmiştir. Buradan yola çıkarak, *X. laevis* iribaşlarının pestisit toksisitesinin belirlenmesi için uygun bir biyoindikatör tür ve seçilen biyobelirteçlerin bu amaçla kullanışlı biyokimyasal parametreler olduğu söylenebilir. Çalışma verilerimiz, doğal habitatları toksik maddeler ile kirletildiğinden, son

zamanlarda populasyonlarında bir azalma görülen amfibiler ile ilgili olarak bu kirleticilerin tek başlarına etkilerinden çok, karışım halindeki etkilerinin belirlenmesinin de önemli olduğu sonucunu doğurmaktadır. Pestisitlerin toksisitesi üzerine pek çok çalışma yapılmış olmasına karşın, pestisitlerin kombine etkileri ile ilgili çok az bilgi mevcuttur ancak doğada pestisitler kimyasal bir karışım olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu nedenle oluşan bu karışımların etkisinin araştırılması, gerçek etkilerin ortaya konmasında oldukça önemlidir. Pestisit kullanımındaki riskleri gösterebilmek ve bu konudaki bilinci arttırmak amacıyla bu ve benzeri çalışmaların daha fazla yapılması gerekmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abbas, R., Hayton, W.L. (1997). A physiologically based pharmacokinetic and pharmacodynamic model for paraoxon in Rainbow trout. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **145**, 192-201.
- Aebi, H. (1974). Catalase (pp: 671–684). In: Bergmayer, H. U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Academic Press, London.
- Agrahari, S. and Gopal, K. (2008). Inhibition of Na⁺-K⁺-ATPase in different tissues of freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) exposed to monocrotophos. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **92**, 57–60.
- Ağar, S., Aydınoglu, H., Temel, O., İkizunal, K., Ece, H. (1991). Pestisit kullanımının tarihçesi, bugünü ve geleceği. *Türk Entomoloji Dergisi.* **15(4)**, 247-256.
- Ahmad S. (1995). Antioxidant Mechanisms of Enzymes and Proteins (pp: 238-265). *Oxidative Stress and Antioxidant Defenses in Biology*. Chapter 7, Springer, USA.
- Ahmad, I., Hamid, T., Fatima, M.H. S. Chand, S. K. Jain, Athar M. and Raisuddin, S. (2000). Induction of hepatic antioxidants in freshwater catfish (*Channa punctatus* Bloch) is a biomarker of paper mill effluent exposure. *Biochim. Biophys. Acta.* **1523**, 37–48.
- Allaerts, W., Ubink, R., de Vente, J., Tuinhof, R., Jenks, B.G., Roubos, E.W. (1997). Nitric oxide synthase and background adaptation in *Xenopus laevis*. *J Chem Neuroanat.* **14(1)**, 21-31.
- Alloway, B.J. and Ayres, D.C. (1997). *Chemical Principles of Environmental Pollution*. Chapman and Hall, 2nd edition, London, UK, 395 pp.
- Altıkat, A., Turan, T., Torun, F.E., Bingül, Z. (2009). Türkiye’de Pestisit Kullanımı ve Çevreye Olan Etkileri. *Atatürk Üniv. Ziraat Fak. Derg.* **40 (2)**, 87-92.
- Anonim. (2013a). <http://www.theguardian.com/environment/2013/jan/31/eu-proposes-ban-insecticides-bee> (on-line access on 31 Jan, 2013).
- Anonim. (2013b). <http://www.tarim.gov.tr/Lists/BasinAciklamalari/AllItems.aspx> ((on-line access on 27 Sep, 2013).
- Anonim. (2013c). http://www.zipcodezoo.com/animals/x/xenopus_laevis/# Taxonomy (on-line access on 29 Aug, 2013).
- Anonim. (2013d). <http://www.xenbase.org/anatomy/alldev.do> (on-line access on 15 Sep, 2013).
- Anonim. (2013e). <http://www.amphibiaweb.org/declines/declines.html#why> (on-line access on 7 Nov, 2013).
- Arias, H.R. (1997). Topology of ligand binding sites on the nicotinic acetylcholine receptor. *Brain Research Reviews.* **25(2)**, 133-191.

- Arias, H.R. (2000). Localisation of agonist and competitive antagonist binding sites on nicotinic acetylcholine receptors. *Neurochemistry International*. **36(7)**, 595-645.
- ASTM, Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* (FETAX), E1439-98, American Society for Testing and Materials, 1998, Philadelphia, PA.
- Asztalos, B., Memcsok, J., Brenedeczky, I., Gabriel, R., Szabo, A. and Refale, O.J. (1990). The effects of Pesticide on some biochemical parameters of carp. (*Cyprinus carpio*). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **19**, 275-282.
- Atkinson, A., Gatemby, A.O., and Lowe, A.G. (1973). The Determination of Inorganic Orthophosphate in Biological Systems. *Biochimica Et Biophysica Acta*. **320**, 195–204.
- Atlı, G. (2009). *Bakır, Çinko, Kadmiyum, Krom ve Gümüş'ün Oreochromis niloticus'un Solungaç ve Böbrek Dokusundaki Na⁺/K⁺-ATPaz, Ca²⁺-ATPaz ve Mg²⁺-ATPaz ile Kas Dokusundaki Ca²⁺-ATPaz Enzim Aktivitesi Üzerine Etkileri*. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Atlı, G. and Canlı, M. (2011). Alterations in ion levels of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following acute and chronic exposures to five heavy metals. *Turkish Journal Of Zoology*. **35(5)**,725-736.
- Atlı, G. and Canlı, M. (2011). Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology*. **20**, 1861–1869.
- Australian Pesticides and Veterinary Medicines Authority (APVMA). (2000). Evaluation of the New Active Trifloxistrobin in the Product Flint Fungicide. http://www.apvma.gov.au/registration/assessment/docs/prs_trifloxystrobin.pdf
- Ayas, Z., Barlas, N., Kolankaya, D. (1996). Determination of organochlorine pesticide residues in various environments and organism in Göksu Delta, Turkey. *Aquatic Toxicology*. **39**, 171-181.
- Aydın, H.G. (2004). *Piretroid grubundan iki insektisitinin Xenopus laevis'de toksik etkileri üzerine bir çalışma*. Yüksek lisans tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Aydın-Sinan, H., Güngördü, A. And Özmen, M. (2012). Toxic effects of deltamethrin and λ -cyhalothrin on *Xenopus laevis* tadpoles. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*. **47**, 397–402.
- Aydın, B. (2011). Effects of thiacloprid, deltamethrin and their combination on oxidative stress in lymphoid organs, polymorphonuclear leukocytes and plasma of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **100**, 165-171.
- Aydın, B. (2011). Effects of thiacloprid, deltamethrin and their combination on oxidative stress in lymphoid organs, polymorphonuclear leukocytes and plasma of rats. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **100 (2)**, 165–171.

- Badiou, A. and Belzunces, L. P. (2008). Is acetylcholinesterase a pertinent biomarker to detect exposure of pyrethroids? A study case with deltamethrin. *Chem. Biol. Interact.* **175**, 406–409.
- Balasundaram, K., Ramalingam, K. and Selvarajan, V. R. (1995). Phosalone poisoning on the cation-linked ATPases of central nervous system of *Rana tigrina* (Daudin). *Camp. Biochem. Physiol.* **111(3)**, 451-455.
- Balza H. (2007). Review of strobilurin fungicide chemicals. *Journal of Environmental Science and Health Part B.* **42**, 441–451.
- Balint, T., Szegletes, T., Szegletes, Zs., Halasy, K., Nemcsbk, J. (1995). Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid Deltamethrin. *Aquatic Toxicology.* **33**, 279–295.
- Banerjee, K., Ligon, A.P., Spitteller, M. (2006). Environmental fate of trifloxystrobin in soils of different geographical origins and photolytic degradation in water. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 9479–9487.
- Bansal, S.K., Murthy, R.C. and Chandra, S.V. (1985). The Effects of Some Divalent Metals on Cardiac and Branchial Ca^{2+} -ATPase in a Freshwater Fish *Saccobranchus fossilis*. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **9**, 373-377.
- Bao, Y., Williamson, G. (1996). The peroxidase activity of Glutathione Stransferase A1-1 on hydroperoxy-phospholipids. *Biochem. Soc. Trans.* **24**, 462S.
- Barbee, G.C. and Stout M.J. (2009). Comparative acute toxicity of neonicotinoid and pyrethroid insecticides to non-target crayfish (*Procambarus clarkii*) associated with rice–crayfish crop rotations. *Pest Manag Sci.* **65**, 1250-1256.
- Barden, G. (2001). Evaluation of the New Active THIACLOPRID in the New Product Calypso 480 SC Insecticide, National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals, P.O. Box E 240 Kingston Act 2604, Canberra, Australia.
- Barron, M. G., Charron, K. A., Stott W. T. and Duvall, S. E. (1999). Tissue carboxylesterase activity of rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* **18(11)**, 2506–2511.
- Barron, M.G., Albro, P.W., Hayton, W.L. (1995a). Biotransformation of di-2-ethylhexyl phthalate by rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.* **28**, 245-252.
- Barron, M.G., Woodburn, K.B. (1995b). Ecotoxicology of chlorpyrifos. *Rev Environ Contam Toxicol.* **144**, 5–16.
- Bartlett, D.W., Clough, J.M., Godwin, J.R., Hall, A.A., Hamer, M., Parr-Dobrzanski, B. (2002). The strobilurin fungicides. *Pest Manag Sci.* **58(7)**, 649-662.
- Battaglin, W.A., Sandstrom, M.W., Kuivila, K.M., Kolpin, D.W., Meyer, M.T. (2010). Occurrence of azoxystrobin, propiconazole, and selected other fungicides in US streams, 2005–2006. *Water Air Soil Pollut.* **218**, 307–322.

- Bayci, M.N.(2011). *Effects of a Neonicotinoid Insecticide on Larval Stages of the Green Frog, Rana clamitans*. Biology Senior Individualized Projects. Kalamazoo College, Michigan, USA.
- Beauvais, L., Jones, S.B., Brewer, S.K., Little, E.E. (2000). Physiological measures of neurotoxicity of diazinon and malathion to larval rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and their correlation with behavioral measures. *Environ. Toxicol. Chem.* **19(7)**,1875–1880.
- Beketov, M. and Liess, M. (2008a). Potential of 11 Pesticides to Initiate Downstream Drift of Stream Macroinvertebrates. *Arch Environ Contam Toxicol.* **55**, 247-253.
- Beketov, M.A. and Liess, M. (2008b). Acute and delayed effects of the neonicotinoid insecticide thiacloprid on seven freshwater arthropods. *Environ Toxicol Chem.* **27(2)**, 461–470.
- Bekmezci, H. D. (2010). *Aşağı Seyhan Ovası Drenaj Sistemlerindeki Kirlilik Etmenlerinin Clarias gariepinus'da Toksik Etkileri*, Doktora tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Belden, J.B., McMurry, S.T., Smith, L.M., Reilley, P. (2010). Acute toxicity of fungicide formulations to amphibians at environmental relevant concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* **29**, 2477–2480.
- Bell, J.G., Cowey, C. B., Adro, J. W., Shanks, A. M. (1985). Some effects of vitamin E and selenium deprivation on tissue enzyme levels and indices of tissue peroxidation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Br. J. Nutr.* **53**,149-157.
- Bello, S. M., Franks, D. G., Stegeman, J. J. and Hahn, M. E. (2001). Acquired resistance to Ah receptor agonists in a population of Atlantic killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a marine superfund site: *in vivo* and *in vitro* studies on the inducibility of xenobiotic metabolizing enzymes. *Toxicol. Sci.* **60**,77-91.
- Beneteau, A.B., Carvalho S.M., Bruneta, J.L., Carvalho, G.A., Bulete A., Giroud B., Belzunces, L.P. (2012). Development of biomarkers of exposure to xenobiotics in the honey bee *Apis mellifera*: Application to the systemic insecticide thiamethoxam. *Ecotox. Environ. Saf.* **82**, 22-31.
- Bernet, D., Schmidt, H., Wahli, T., Burkhardt-Holm, P. (2001). Effluent from a sewage treatment works causes changes in serum chemistry of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **48**, 140-147.
- Bianchini, A. and Wood, C.M. (2003). Mechanism of Acute Silver Toxicity in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry.* **22(6)**, 1361–1367.
- Bianchini, A., Martins, S.E.G. and Barcarolli, I.F. (2004). Mechanism of Acute Copper Toxicity in Euryhaline Crustaceans: Implications for the Biotic Ligand Model. *International Congress Series.* **1275**, 189– 194.
- Bianchini, A., Playle, R.C., Wood, C.M. and Walsh, P.J. (2005). Mechanism of Acute Silver Toxicity in Marine Invertebrates. *Aquatic Toxicology.* **72**, 67–82.

- Birhanlı A. (2003). *Bazı Tekstil Boyar Maddelerinin Xenopus laevis Üzerinde Toksik Etkilerinin Araştırılması*. Doktora tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Blaustein, A.R. (1994). Chicken Little or Nero's fiddle? A perspective on declining amphibian populations. *Herpetologica*. **50(1)**, 85-97.
- Boğa, A. (1996). *Dış Ortamda Yer Alan Çeşitli Kimyasal Kirliliklerin Embriyo Gelişimi Üzerine Etkisini Değerlendirmede FETAX Testinin Değeri*. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Brunton, L.L., Chabner, B.A., Knollmann, B.C. (2011). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. McGraw-Hill, New York, 135–136 p.
- Bulut, V.N. ve Tüfekçi, M. (2005). Trabzon (Maçka) Kalyan Akarsuyunun Su Kalitesinin İncelenmesi (pp. 377-384). *Ulusal Su Günleri Sempozyumu*, Karadeniz Teknik Üniversitesi, 28-30 Eylül 2005, Trabzon.
- Camera, E., and Picardo, M. (2002). Analytical methods to investigate glutathione and related compounds in biological and pathological processes. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **781**, 181–206.
- Canik, F. ve Yüksel, N.Y. (2012). Gıda Güvenliği ve Pestisitler. *TEPGE (Tarımsal Ekonomi ve Politika Geliştirme Enstitüsü) BAKIŞ*. **14**, 1-4.
- Capowiez, Y., Rault, M., Mazzia, C., Belzunces, L. (2003). Earthworm behaviour as a biomarker – a case study using imidacloprid. *Pedobiologia*. **47**, 542-547.
- Carson, R. (1962). *The Silent Spring*. Mariner Books. New York, USA, 1-275 p.
- Carvalho, F. (2006). Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science & Policy*. **9**, 685–692.
- Cashman, J. R., Perotti, B. Y. T., Berkman C. E. and Lin, J. (1996). Pharmacokinetics and molecular detoxication. *Environ. Health Perspect.* **104(1)**, 23–40.
- Casida, J.E., Quistad, G.B. (2004). Why Insecticides are more toxic to insect than people: The unique toxicology of insects. *J. Pestic. Sci.* **29**, 81-86.
- Cecchine, G., Golomb, B.A., Hilborne, L.H., Spektor, D.M., Anthony, C.R. (2000). (pp:5-14). *A Review of the Scientific Literature as it Pertains to Gulf War Illnesses*. Vol. 8, Pesticides. Santa Monica, CA: RAND, MR-1018/8-OSD.
- Chamaon, K., Smalla, K.H., Thomas, U. and Gundelfinger, E.D. (2002). Nicotinic acetylcholine receptors of Drosophila: three subunits encoded by genomically linked genes can co-assemble into the same receptor complex. *J. Neurochem.* **80**, 149-157.
- Chelikani, P., Fita, I., Loewen, P.C. (2004). Diversity of structures and properties among catalases. *Cell Mol.Life Sci.* **61**,192-208.

- Corringer, J.P., Le Novere, N. and Changeux, J.P. (2000). Nicotinic receptors at the amino acid level. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **40**, 431-458.
- Cribb, A. E., Leeder, J. S., Spielberg, S. P., (1989), Use of a microplate reader in an assay of glutathione reductase using 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid). *Anal. Biochem.* **183**, 195-196.
- De la Torre, F. R., Ferrari L. and Salibián, A. (2005). Biomarkers of a native fish species (*Cnesterodon decemmaculatus*) application to the water toxicity assessment of a peri-urban polluted river of Argentina. *Chemosphere.* **59**, 577–583.
- De La Torre, F.R., Salibian, A. and Ferrari, L. (2007). Assessment of the Pollution Impact on Biomarkers of Effect of a Freshwater Fish. *Chemosphere.* **68**, 1582-1590.
- De Zwart, L.L., Meerman, J.H.N., Commandeur, J.N.M. and Vermeulen, N.P.E. (1999). Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans. *Free Radical Biol. Med.* **26**, 202-226.
- Deaton, C.M. and Marlin, D.J. (2003). Exercise-Associated Oxidative Stress. *Clinical Techniques in Equine Practice.* **2(3)**, 278-291.
- Delen, N., Güncan, A., Güngör, N., Turgut, C. ve Burçak, A. (2005). *Türkiye’de Pestisit Kullanımı, Kalıntı ve Organizmalarda Duyarlılık Azalışı Sorunları* (pp: 629-648). 6. Türkiye Ziraat Mühendisliği Teknik Kongre, 3-7 Ocak, Ankara.
- Delgado, M.J., Cespedes, M.V., De Pedro, N., Alonso-Bedate, M., Alonso-Gomez, A.L. (2001). Day/night variations of dopamine ocular content during *Xenopus laevis* ontogeny. *Neuro-sci. Lett.* **300**, 129-132.
- Demirci, Ö., (2013). *Çeşitli Pestisitlerin Gammarus kischineffensis’in Antioksidan Enzim Sistemi ve Bazı Biyobelirteçler Üzerine Etkisi*. Doktora tezi, Dicle Üniversitesi, Diyarbakır.
- Diaz, M., Cozzi, S., Almansa, E., Casariego, M., Bolanos, A., Cejas, J., and Lorenzo, A. (1998). Characterization of Intestinal Na⁺-K⁺-ATPase in the Gilthead Seabream (*Sparus aurata* L.). Evidence for a Tissue-Specific Heterogeneity. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B.* **121**, 65-76.
- Doğan, Z. (2013). *Ca⁺², Pb⁺² ve Ca⁺²+ Pb⁺² Etkisinde kalan balık (Oreochromis niloticus) dokularında Na⁺/K⁺-ATPaz, Ca⁺²-ATPaz ve Mg⁺²-ATPaz aktivitelerinin belirlenmesi*. Yüksek Lisans Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Dondero, F., Negri, A., Boatti, L., Marsano, F., Mignone, F., Viarengo, A. (2010). Transcriptomic and proteomic effects of a neonicotinoid insecticide mixture in the marine mussel (*Mytilus galloprovincialis*, Lam.). *Science of the Total Environment.* **408**, 3775-3786.
- Dumpert, K. (1987). Embryotoxic effects of environmental chemicals: tests with the South African clawed toad (*Xenopus laevis*). *Ecotoxicol Environ Saf.* **13(3)**, 324-38.

- Dutta, H.M., Arends, D.A. (2003). Effects of endosulfan on brain acetylcholinesterase activity in juvenile bluegill sunfish. *Environ. Res.* **91**, 157–162.
- El-Gendy, K.S. (1990). The effects of thiodicarb and cypermethrin on some liver enzymes of rats. *Bull. Alex Fac. Med.* **36**, 607–612.
- Ellman, G. L., Andres, D. C. (1961). New and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* **7**, 88–95.
- EPA (Environmental Protection Agency). (2002). *Trifloxystrobin; Pesticide Tolerance, Rules and Regulations*. Federal Register. **67(99)**, 35915-35924.
- EPA (Environmental Protection Agency). (2003) *Pesticide Fact Sheet Name of Chemical: Thiachloprid Reason for Issuance*. Conditional Registration Date Issued: September 26.
- Eroğlu, A. and Canli, M. (2013). Effects of Cd, Zn and Cd plus Zn Combination on ATPase Activity in the Gill and Muscle of Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Bulletin Of Environmental Contamination and Toxicology.* **91(4)**, 420-425.
- European Commission. (2003). Trifloxystrobin SANCO/4339/2000 European commission; Health & Consumer Protection Directorate - General. http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/list1-18_en.pdf.
- European Commission. (2004). Thialoprid SANCO/4347/2000 European commission; Health & Consumer Protection Directorate- Arch Environ Contam Toxicol 123 General. <http://ec.europa.eu/food/plant/protection/evaluation/newactive/thiachloprid.pdf>. Accessed July 21, 2009.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2013). Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for bees for the active substance clothianidin. *EFSA Journal.* 11(1), 3066.
- Ezemonye, L., Tongo, I., (2010). Sublethal effects of endosulfan and diazinon pesticides exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos. *Chemosphere.* **65(10)**, 1814–1820.
- Fan, C., Zhang, S., Liu, Z., Li, L., Luan, J. and Saren, G. (2007). Identification and expression of a novel class of glutathione-S-transferase from amphioxus *Branchiostoma belcheri* with implications to the origin of vertebrate liver. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **39**, 450–461.
- Fernández-Ortuño, D., Torés, JA., De Vicente, A. and Pérez-García, A. (2010). (pp. 203-220). *Fungicides*. Chapter 10. InTech opens science/ open minds. Croatia.
- Ferrari, A., Venturino, A., Pechen de D'Angelo A. M. (2007). Effects of carbaryl and azinphos methyl on juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) detoxifying enzyme. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **88**,134–142.
- Ferrari, A., Lascano, C. I., Anguiano, O. L., Pechen de D'Angelo A. M. (2009). Antioxidant responses to azinphos methyl and carbaryl during the embryonic

- development of the toad *Rhinella (Bufo) arenarum* Hensel. *Aquatic Toxicology*. **93**, 37–44.
- Ferrari, A., Lascano, C., Pechen de D'Angelo, A. M., Venturino, A. (2011). Effects of azinphos methyl and carbaryl on *Rhinella arenarum* larvae esterases and antioxidant enzymes. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*. **153**, 34–39.
- Firat, Ö., Cogun, H.Y., Yüzereroğlu, T.A., Gök, G., Firat, Ö., Kargin, F., Kötemen, Y. (2011). A comparative study on the effects of a pesticide (cypermethrin) and two metals (copper, lead) to serum biochemistry of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol Biochem*. **37**, 657–666.
- Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas-Fernandes, A., Peixoto, F., Rocha, E. and Reis-Henriques, M. A. (2006). Effects of gender and temperature on oxidative stress enzymes in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* exposed to paraquat, *Pest. Biochem. Physiol.* **85**, 97-103.
- Food and Agriculture Organization (FAO). *Control of water pollution from agriculture*. Chapter 4. Pesticides as water pollutants Corporate Document Repository (<http://www.fao.org/docrep/w2598e/w2598e07.htm>).
- Ford, K.A., Casida, J.E. 2006. Unique and common metabolites of thiamethoxam, clothianidin, and dinotefuran in mice. *Chem. Res. Toxicol*, **19**, 1549-1556.
- Fulton, M.H., Key, P.B. (2001). Acetylcholinesterase inhibition in estuarine fish and invertebrates as an indicator of organophosphorus insecticide exposure and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 37-45.
- Gadzała-Kopciuch, R., Berecka, B., Bartoszewicz, J., Buszewski, B. (2004). Considerations about bioindicators in environmental monitoring. *Polish Journal of Environmental Studies*. **13(5)**, 453-462.
- Gillardard, V., Silvestre, F., Divoy, C., Thome, J-P., Kestemont, P. (2009). Effects of Aroclor 1254 on oxidative stress in developing *Xenopus laevis* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **72**, 546–551.
- Godiksen, H. and Jessen, F. (2002). Temperature and Ca²⁺-dependence of the Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺-ATPase in Haddock, Salmon, Rainbow Trout and Zebra cichlid. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*. **133**, 35–44.
- Goulson D, (2013), An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*. **50**, 977-987.
- Gökmen, S. (2011). *Genel Ekoloji*. Nobel Yayın, Ankara, Türkiye, 465 p.
- Green, S.L. (2010). *The Laboratory XENOPUS sp.*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 180 p.
- Grosell, M., Wood, C.M. and Walsh, P. (2003). Copper Homeostasis and Toxicity in the Elasmobranch *Raja erinacea* and the Teleost *Myoxocephalus*

- octodecemspinosus* during Exposure to Elevated Water-borne Copper. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. **135**, 179–190.
- Guo, N. N. H., Zhang, A., Li, Z., Yin, L. (2009). *in vitro* and *in vivo* acute toxicity of fenpyroximate to flounder *Paralichthys olivaceus* and its gill cell line FG. *Aquatic Toxicology*. **92**, 76–85.
- Gül, Ş., Belge-Kurutaş, E., Yıldız, E., Şahan, A. and Doran, F. (2004). Pollution correlated modifications of liver antioxidant systems and histopathology of fish (Cyprinidae) living in Seyhan Dam Lake, Turkey. *Environ. Int.* **30(5)**, 605-609.
- Güler, Ç. ve Çobanoğlu, Z. (1997). Pestisitler, *Çevre Sağlığı Temel Kaynak Dizisi*. **52**, 9-173.
- Güneş, G. (2010). *Sağlıklı Bireylerde Serum Alanin Aminotransferaz Seviyesi ve Alanin Aminotransferaz seviyesini Etkileyen Faktörler*. Uzmanlık tezi, Ufuk Üniversitesi, Ankara.
- Güngördü, A. (2007). *Karakaya Baraj Gölünün Su Kalitesinin Ekotoksikolojik Yaklaşım ile Değerlendirilmesi*. Doktora tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Güngördü, A. Erkmen, B., Kolankaya, D. (2012). Evaluation of spatial and temporal changes in biomarker responses in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) for biomonitoring the Meric, Delta, Turkey. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **33**, 431–439.
- Güngördü, A. (2013). Comparative toxicity of methidathion and glyphosate on early life stages of three amphibian species: *Pelophylax ridibundus*, *Pseudepidalea viridis* and *Xenopus laevis*. *Aquatic Toxicology*. **140(141)**, 220–228.
- Güngördü, A., Birhanlı, A., Özmen, M. (2013a). Biochemical response to exposure to six textile dyes in early developmental stages of *Xenopus laevis*. *Environ Sci Pollut Res*. **20**, 452–460.
- Güngördü, A., Sireci, N., Küçükbay, H., Birhanlı, A., Özmen, M. (2013b). Evaluation of *in vitro* and *in vivo* toxic effects of newly synthesized benzimidazole-based organophosphorus compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **87**, 23-32.
- Günşar, F. (2003). Karaciğer Enzim Profilineki Değişikliklerde Yaklaşımlar. *Güncel Gastroenteroloji*. **7(3)**, 192-203.
- Güven, K. (1999). *Biyokimyasal ve moleküler toksikoloji*. Dicle Üniversitesi Basımevi, Diyarbakır, Turkey, 17 p.
- Habig, W. H., Pabst, M. J., Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130–7139.
- Hamed, R.R., Farid, N.M., Elowa, S.H.E., Abdalla, A. M. (2003). Glutathione Related Enzyme Levels of Freshwater Fish as Bioindicators of Pollution, *The Environmentalist*. **23**, 313–322.

- Hayes, J. D., Flanagan, J.U., Jowsey, I.R. (2005). Glutathione transferases. *Annu. Rev.Pharmacol. Toxicol.* **45**, 51–88.
- Hazarika, A., Sarkar, S. N., Haiare, S., Kataria, M., Malik, J.K. (2003). Influence of malathion pretreatment on the toxicity of anilofos in male rats: a biochemical interaction study. *Toxicology.* **185**, 1-8.
- Heath, A.G., (1987). *Water Pollution and Fish Physiology*. CRC press, Florida, USA, 245 p.
- Hilken, G., Dimigen, J., Iglauer, F. (1995). Growth of *Xenopus laevis* Under Different Laboratory Rearing Conditions. *Lab. Anim.* **29**, 152-162.
- Honda H., Tomizawa M., Casida J.E. (2006). Neonicotinoid metabolic activation and inactivation established with coupled nicotinic receptor-CYP3A4 and –aldehyde oxidase systems. *Toxicology Letters.* **161**, 108-114.
- Hooser, E.A., Belden, J.B., Smith, L.M., McMurry, S.T. (2012). Acute toxicity of three strobilurin fungicide formulations and their active ingredients to tadpoles. *Ecotoxicology.* **21**, 1458–1464.
- Hopwood, J., Vaughan, M., Shepherd, M., Biddinger, D., Mader, E., Black, S.H., Mazzacano, C. (2012). “Are Neonicotinoids Killing Bees” A review of research into the effects of neonicotinoid insecticides on bees, with recommendations for action. The Xerces Society for Invertebrate Conservation, Portland 1-32.
- Hornby, J.E., Muntz, L., Gough, P. (1989). An electrophoretic comparison of the LDH isozyme distribution during the development of the tadpole tails of the aquatic toad *Xenopus laevis* and the amphibian frog *Rana temporaria*. *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Biochem. Mol. Biol.* **93(1)**, 85-92.
- Hosokawa, M. (2008). Structure and Catalytic Properties of Carboxylesterase Isozymes Involved in Metabolic Activation of Prodrugs. *Molecules.* **13**, 412-431.
- Huang, T. L., Obih, P. O., Jaiswal, R., Hartley W. R. and Thiyagarajah, A. (1997). Evaluation of liver and brain esterases in the spotted gar fish (*Lepisosteus oculatus*) as biomarkers of effect in the lower Mississippi River basin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **58**, 688–695.
- Hüter, O. (2011). Use of natural products in the crop protection industry. *Phytochem Rev.* **10**, 185–194.
- Igarashi, M., Ishibashi, T., Nishihira, J. and Tachikawa H. (2003). Energetics of Catalytic Reaction of Acetylcholinesterase (AChE) with Acetylcholine (ACh): Role of the Oxyanion Hole. *Internet Electronic Journal of Molecular Design.* **2**, 712–722.
- Izawa S., Inoue Y. and Kimura A. (1996). Importance of catalase in the adaptive response to hydrogen peroxide: analysis of acatalasaemic *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem.J.* **320**, 61–67.

- Jahan-Tigh, R. R. (2002). Glutathione S-Transferase as a Biomarker of Heavy Metal Exposure in a Neotropical Fish Community. MSc Thesis, Houston Clear Lake University, USA.
- Jemec, A., Tisler, T., Drobne, D., Sepcic, K., Fournier, D., Trebse, P. (2007). Comparative toxicity of imidacloprid, of its commercial liquid formulation and of diazinon to a non-target arthropod, the microcrustacean *Daphnia magna*. *Chemosphere*. **68**, 1408-1418.
- Jeschke, P., Moriya, K., Lantsch, R., Seifert, H., Lindner, W., Jelich, A., Gohrt, A., Beck, M.E., Etzel, W. (2001). Thiacloprid (Bay YRC 2894): a new member of the chloronicotiny insecticide (CNI) family. *Pflanzenschutz Nachr Bayer*. **54**, 147-160.
- Jeschke P. and Nauen R. (2008). Neonicotinoids: from zero to hero in insecticide chemistry. *Pest Manag Sci*. **64**, 1084-1098.
- Jeschke, P., Nauen, R., Schindler, M. & Elbert, A. (2011). Overview of the status and global strategy for neonicotinoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **59**, 2897-2908.
- Johansson, M., Piha, H., Kylin, H., Merila, J. (2006). Toxicity of six pesticides to common frog (*Rana temporaria*) tadpoles. *Environmental Toxicology and Chemistry*. **25(12)**, 3164-3170.
- Jokanović, M. (2001). Biotransformation of organophosphorus compounds. *Toxicology*. **66(3)**, 139-160.
- Junges, C.M., Peltzer, P.M., Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., M.C.C., Zenklusen, Basso, A. (2012). Toxicity of the fungicide trifloxystrobin on tadpoles and its effect on fish-tadpole interaction. *Chemosphere*. **87**, 1348-1354.
- Kakko, I., Toimela, T., Tahti, H. (2000). Piperonyl butoxide potentiates the synaptosome ATPase inhibiting effect of pyrethrin. *Chemosphere*. **40(3)**, 301-305.
- Karaca M. (2010). *Sucul Sistem Canlılarında Organoklorlu Pestisitlerin Analizi ve Antioksidan EnzimAktivitelerinin Biyogösterge Amaçlı Uygulanması*. Yüksek lisans tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Kaufer, D., Friedman, A., Seidman, S., Soreq, H. (1998). Acute stress facilitates long-lasting changes in cholinergic gene expression. *Nature*. **393**, 373-377.
- Kazancı, N., Girgin, S. (1998). Three biological methods for assessment and monitoring of water quality of aquatic ecosystems in Turkey. (pp: 51-63). *Proceeding of 3th aquaculture symposium of Eastern Turkey*.
- Kelly, S. A., Havrilla, C. M., Brady, T. C., Abrama, K. H., Levin, E.D. (1998). Oxidative Stress in Toxicology Established Mammalian and Emerging Piscine Model System. *Environmental Health Perspective*. **106(7)**, 375-384.

- Kenan, O. (2007). *Aliğa Körfezindeki Deniz Kirliliğinin Bölge Kefal Balıklarında Kirliliğin Biyogöstergesi Olan Karaciğer EROD Enzim Aktivitesi ve Balıktaki Çeşitli Metal Düzeyleri İle Belirlenmesi*. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Kim, S., Lee, Y., Lazar, P., Son, M., Baek, A., Thangapandian, S., Jeong, N. Y., Yoo, Y. H., Lee, K. W. (2011). Binding conformation prediction between human cetylcholinesterase and cytochrome c using molecular modeling methods. *Journal of Molecular Graphics and Modelling*. **29**, 996–1005.
- Klaassen, C. D. (2001). *Casarett & Doull's Toxicology - The Basic Science of Poisons*, 7th Ed. McGraw-Hill, New York, USA, 17;133–225; 883-930 pp.
- Kocaman A.Y. ve Topaktaş M. (2007). In vitro evaluation of the genotoxicity of acetamiprid in human peripheral blood lymphocytes. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. **48**, 483-490.
- Kocaman, A.Y. (2007). *Acetamiprid ve Alpha-Cypermethrin pestisidlerinin tek başına ve karışım halinde kullanıldıkları zaman insan periferel lenfositlerindeki in vitro genotoksik etkileri*. Doktora Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Kocataş, A. (2010). *Ekoloji ve Çevre Biyolojisi*. Ege Üniversitesi basımevi, İzmir, Türkiye, 585 p.
- Korkutan, S., Comelekoglu, U., Yalin, S., Berkoz, M., Eroglu, P., Sogut, F. (2008). Investigation of lipid peroxidation in isolated muscle tissue following in vitro application of indoxacarb. (pp:41). *2nd International Congress on Cell Membranes and Oxidative Stress: Focus on Calcium Signaling and TRP Channels*. Süleyman Demirel University Medical Faculty Department of Biophysics, June 25-28, Isparta, Turkey.
- Kukreja, R. C., Okabe, E., Schrier, G. M., Hess, M. L. (1988). Oxygen radical-mediated lipid peroxidation and inhibition of Ca⁺²-ATPase activity of cardiac sarcoplasmic reticulum. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. **261(2)**, 447-457.
- Kumar, V.A., Janaiah, C. and Venkateshwarlu, P. (2010). Impact of Thiamethoxam on Proteases, Aminases and Glutamate Dehydrogenase in Some Tissues of Freshwater Fish, *Channa punctatus* (Bloch). *The Bioscan*. **5(1)**, 135-137.
- Kühn, H. and Borchert, A. (2002). Regulation of Enzymatic Lipid Peroxidation: The Interplay of Peroxidizing and Peroxide Reducing Enzymes. *Free Radical Biology & Medicine*. **3(2)**, 154–172.
- Küster, E. (2005). Cholin- and carboxylesterase activities in developing zebrafish embryos (*Danio rerio*) and their potential use for insecticide hazard assessment. *Aquat. Toxicol.* **75(1)**,76–85.
- Kyle, D., Hoagland, R.W., Drenner, J., Smith, D., Cross, D.R. (1993). Freshwater Community Responses to Mixtures of Agricultural Pesticides: Synergistic Effects of Atrazine and Bifenthrin. *Environ. Toxicol. Chem.* **12**, 627–637.

- Laetz, C. A., Baldwin, D. H., Collier, T. K., Hebert, V., Stark, J. D., Scholz, N. L. (2009). The Synergistic Toxicity of Pesticide Mixtures: Implications for Risk Assessment and the Conservation of Endangered Pacific Salmon. *Environmental Health Perspectives*. **117**(3), 348-353.
- Lajmanovich, R.C., Attademo, A.M., Peltzer, P.M., Junges, C.M., Cabagna, M.C. (2011). Toxicity of Four Herbicide Formulations with Glyphosate on *Rhinella arenarum* (Anura: Bufonidae) Tadpoles: B-esterases and Glutathione S-transferase Inhibitors. *Arch Environ Contam Toxicol*. **60**, 681–689.
- Langer-Jaesrich M, Köhler HR, Gerhardt A. (2010). Assessing Toxicity of the Insecticide Thiacloprid on *Chironomus riparius* (Insecta: Diptera) Using Multiple End Points. *Arch Environ Contam Toxicol*. **58**, 963-972.
- Larsson, A., Haux, C. and Sjobeck, M. (1985). Fish Physiology and Metal Pollution: Results and Experiences from Laboratory and Field Studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **9**, 250-281.
- Li, Z-H., Zlabek, V., Grabic, R., Li, P., Machova, J., Velisek, J., Randak, T. (2010). Effects of exposure to sublethal propiconazole on intestine-related biochemical responses in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Chemico-Biological Interactions*. **185**, 241–246.
- Linder, G., Krest, S.K., Shank, D., Sparling, D.W., (2003). *Amphibian Decline: An Integrated Analysis of Multiple Stressor Effects*. SETAC, Pensacola, FL, USA, 1-315 pp.
- Lionetto, M. G, Caricato, R., Giordano M. E. and Schettino, T. (2004). Biomarker application for the study of chemical contamination risk on marine organisms in the Taranto marine coastal area. *Chem. Ecol*. **20**(1), 333-343.
- Liu, G.-Y., Ju, X.-L., Cheng, J. (2010). Selectivity of imidacloprid for fruit fly versus rat nicotinic acetylcholine receptors by molecular modelling. *Journal of Molecular Modelling*. **16**, 993-1002.
- Lockridge, O., Schopfer, L.M. (2006). Biomarkers of organophosphate exposure. (pp: 703–711). In: Gupta, R.C.(Ed.), *Toxicology of Organophosphate and Carbamate Compounds*. Academic Press, London, UK.
- Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C. A., Krieger, M., Scott, M. P., Bretscher, A., Ploegh, H. and Matsudaira, P. (2008). *Molecular Cell and Biology*. W.H. Freeman & Company, New York, USA, 437-476 pp.
- Lopez-Lopez, E., Seden-Diaz, J.E., Soto, C., Favari, L. (2011). Responses of antioxidant enzymes, lipid peroxidation, and Na⁺/K⁺-ATPase in liver of the fish *Goodea atripinnis* exposed to Lake Yuriria water. *Fish Physiol Biochem*. **37**, 511–522.
- Machala, M., Drabek, P., Neca, J., Kolarova, J. and Svobodova, Z. (1998). Biochemical markers for differentiation of exposures to nonplanar polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, or 2,3,7,8-

- tetrachlorodibenzo-p-dioxin in trout liver. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **41(1)**, 107-111.
- Malbrouck, C., Trausch, G., Devos, P., Kestemont, P. (2003). Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*. **135**, 39-48.
- Malev, O., Klobucar, R. S., Fabbretti, E., Trebše P. (2012). Comparative toxicity of imidacloprid and its transformation product 6-chloronicotinic acid to non-target aquatic organisms: Microalgae *Desmodesmus subspicatus* and amphipod *Gammarus fossarum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. **104**, 178–186.
- Mann, R. and Bidwell, R. (2000). Application of the FETAX protocol to assess the developmental toxicity of nonylphenol ethoxylate to *Xenopus laevis* and two Australian frogs. *Aqua. Toxicol.* **51**, 19-29.
- Marvelli, I., Rotilio, G. (1984). *Oxygen free radicals, and tumor cells, icosanoids and cancer*. Raven Press, New York, 1-10 pp.
- Matsuda, K., Buckingham, S.D., Kleier, D., Rauh, J.J., Grauso, M. and Sattelle, D.B. (2001). Neonicotinoids: insecticides acting on insect nicotinic acetylcholine receptors. *TRENDS in Pharmacological Sciences*. **22(11)**, 571-580.
- Meister, R.T. (1999). Farm Chemicals Handbook '99. Meister Publishing Company Willoughby, OH, USA.
- Miller, G.T. (2002). *Living in the Environment*. Wadsworth/Thomson Learning. Belmont, CA, USA. 443 p.
- Mishchuk, O.V. and Stolyar, O.B. (2008). The Effect of Pesticide Acetamiprid on The Status of Biochemical Markers in Tissues of Freshwater Bivalve Mussels *Anodonta cygnea* L. (Unionidae). *Ukrainian Biochemical Journal*. **5**, 117-124.
- Mishra, R. and Shukla, S. P. (1997). Impact of endosulfan on lactate dehydrogenase from the freshwater catfish *Clarias batrachus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **57(3)**, 220-234.
- Monteiro, M., Quintaneiro, C., Nogueira, A. J. A., Morgado, F., Soares, A. M. V. M. and Guilhermino, L. (2007). Impact of chemical exposure on the fish *Pomatoschistus icrops* Krøyer (1838) in estuaries of the Portuguese Northwest coast. *Chemosphere*. **66(3)**, 514–522.
- Mudaraddi, T.Y., Potadar, R. R., Kaliwal, B.B. (2012). Indoxacarb induces liver oxidative stress in Swiss Albino Mice. *Eur. J Exp. Bio.*, 2, 180-186.
- National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals. (2001). *Public Release Summary on Evaluation of the new active THIACLOPRID in the new product Calypso 480 SC Insecticide*. November, Canberra, Australia.
- Nauen, R., Ebbinghaus, U. and Tietjen, K. (1999). Ligands of the nicotinic acetylcholine receptors as insecticides. *Pesticide Science*. **55**, 608-610.

- Nelson D. L. and Cox, M. M. (2004). *Lehninger Principles of Biochemistry*, (fourth ed.), Worth Publishers, New York, USA, 577 p.
- Newson, L.D. (1967). Consequences of insecticide use on nontarget organism. *Ann. Rev. Entomol.* **12**, 257-286.
- Nousiainen, U., Torronen, R. (1984). Differentiation of microsomal and cytosolic carboxylesterases in rat liver by *in vivo* and *in vitro* inhibition. *Gen. Pharmacol.* **15**, 223–227.
- Okuşluk, Ö. (2008). *Mogan Gölü'ndeki Olası Kirlenmenin Sazan Balıklarına (Cyprinus carpio L.) Comet Testi Kullanılarak Araştırılması*. Yüksek lisans tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara.
- Oliveira, M., Serafim, A., Bebianno, M. J., Pacheco, M. and Santos, M. A. (2008). European eel (*Anguilla anguilla* L.) metallothionein, endocrine, metabolic and genotoxic responses to copper exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **70**, 20–26.
- Ongley, E.D. (1996). Control of water pollution from agriculture FAO Irrigation and Drainage, , Rome, Italy, 55 p.
- Oruç, E. Ö. and Üner, N. (2000). Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus*. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* **127**, 291–296.
- Oruç, E.O., Sevgiler, Y., Üner, N. (2004). Tissue-specific oxidative stress responses in fish exposed to 2,4-D and azinphosmethyl. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C.* **137**, 43–51.
- Oruç, E.Ö. and Usta, D. (2007). Evaluation of oxidative stress responses and neurotoxicity potential of diazinon in different tissues of *Cyprinus carpio*. *Environmental Toxicology and Pharmacology.* **23**, 48–55.
- Osterauer, R. and Köhler, H.-R. (2008). Temperature-dependent effects of the pesticides thiacloprid and diazinon on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Aquatic Toxicology.* **86**, 485–494.
- Ören, P. (2009). *Malathion'un Oreochromis niloticus'ta Oksidatif Stres Kaynaklı Endokrin Bozucu Etkileri*. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Özgüven T. (1991). *Xenopus Fizyolojisi*, Ders Notu, Adana.
- Özgüven T. (1994). *Xenopus laevis'te Deneysel Embriyoloji*. Ders Notu, Adana.
- Özmen, M., Dominguez, S. E., Fairbrother, A. (1998). Effects of dietary azinphos methyl on selected plasma and tissue biomarkers of the gray-tailed vole. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* **60**, 194-201.
- Paller, M.S., Patent, M.T. (1991). Hydrogen peroxide and ischemic renal injury: effect of catalase inhibition. *Free Radical Biol. Med.* **10**. 29-34.
- Pandey, S., Ahmad, I., Parvez, S., Bin-Hafeez, B., Haque, R., Raisuddin S. (2001). Effect of Endosulfan on Antioxidants of Freshwater Fish *Channa punctatus*

- Bloch: 1. Protection Against Lipid Peroxidation in Liver by Copper Preexposure. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **41**, 345–352.
- Pandey, S., Parvez, S., Sayeed, I., Haque, R., Bin-Hafeez B. and Raisuddin, S. (2003). Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.). *Sci. Total Environ.* **309**, 105–115.
- Parvez, S., Sayeed, I. and Raisuddin, S. (2006). Decreased Gill ATPase Activities in the Freshwater Fish *Channa punctata* (Bloch) Exposed to a Diluted Paper Mill Effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **65**, 62–66.
- Peakall, D.W. and Walker, C.H. (1994). Biomarkers: the way forward in environmental assesment. *Toxicol. Ecotoxicol. News.* **3**, 173-179.
- Peixoto, F., Alves-Fernandes, D., Santos D. and Fontainhas-Fernandes, A. (2006). Toxicological effects of oxyfluorfen on oxidative stress enzymes in tilapia *Oreochromis niloticus*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **85**, 91-96.
- Prati, M., Biganzoli, E., Boracchi, P., Tesauro, M., Monetti, C., Bernardini, G. (2000). Ecotoxicological soil evaluation by FETAX. *Chemosphere.* **41**, 1621-1628.
- Pretti, C. and Cognetti-Varriale, A. M. (2001). The use of biomarkers in aquatic biomonitoring: the example of esterases. *Aquat. Conserv.* **11**, 299–303.
- Puinean A.M., Denholm I., Millar N.S., Nauen R., Williamson M.S. (2010). Characterisation of imidacloprid resistance mechanisms in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stal (Hemiptera: Delphacidae). *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **97**, 129-132.
- Qi, S., Wang, C., Chen, X., Qin, Z., Li, X., Wang, C. (2013). Toxicity assessments with *Daphnia magna* of Guadipyr, a new neonicotinoid insecticide and studies of its effect on acetylcholinesterase (AChE), glutathione S-transferase (GST), catalase (CAT) and chitobiase activities. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **98**, 339-344.
- Ramaswamy, M., Thangavel, P. and Selvam, N. P. (1999). Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) enzyme activities in different tissues of *Sarotherodon mossambicus* (Peters) exposed to a carbamate pesticide, carbaryl. *Pestic. Sci.* **55**, 1217-1221.
- Rao, J. V. (2006). Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* on glutathione-S-transferase (GST) in various tissues of adult amphibians (*Bufo regularis*). *Chemosphere.* **81**, 214–217.
- Reading, H.W. and Isbir, T. (1980). The role of cation activated ATPase in transmitter releare from the art iris. *QJ Exp Physiol.* **65**, 105-116.
- Ribeiro, M.G.L., Pedrenho, A.R., and Hasson-Voloch, A., (2002). Electrocyte (Na⁺–K⁺)-ATPase Inhibition Induced by Zinc is Reverted by Dithiothreitol. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology,* **34**, 516–524.

- Richards, S.M. and Kendall, R.J. (2003). Physical effects of chlorpyrifos on two stages of *Xenopus laevis*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, **66**, 75-91.
- Riedel, B. and Christensen, G. (1979). Effect of Selected Water Toxicants and Other Chemicals upon Adenosine Triphosphatase Activity *in vitro*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*. **23**, 365-368.
- Robles-Mendoza, C., Zuniga-Lagunes, S.R., Ponce de Leon-Hill, C. (2011). A Esterases activity in the axolotl *Ambystoma mexicanum* exposed to chlorpyrifos and its implication to motor activity. *Aquatic Toxicology*. **105**, 728– 734.
- Rodrigues, E.T., Lopes, I., Pardal, M.A. (2013) Occurrence, fate and effects of azoxystrobin in aquatic ecosystems: A review. *Environment International*. **53**, 18–28.
- Rodrigues, K.J.A., Santana, M.B., Do Nascimento, J.L.M., Picanço-Diniz, D.L.W., Maues, L.A.L., Santos, S.N., Ferreira, V.M.M., Alfonso, M., Duran, R., Faro, L.R.F. (2010). Behavioral and biochemical effects of neonicotinoid thiamethoxam on the cholinergic system in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **73**, 101-107.
- Rosenbaum, E. A., Duboscq, L., Soleño, J., Montagna, C. M., Ferrari, A., Venturino, A. (2012). Response of biomarkers in amphibian larvae to in situ exposures in a fruit-producing region in North Patagonia, Argentina. *Environ Toxicol Chem*. **31(10)**, 2311-2317.
- Ru, S., Wei, X., Jiang, M. and Li, Y. (2003). *in vivo* and *in vitro* inhibitions of red drum (*Sciaenops ocellatus*) brain acetylcholinesterase and liver carboxylesterase by monocrotophos at sublethal concentrations. *Water Air Soil Pollut*. **149**, 17–25.
- Saka, M. (2003). Examination of an amphibian-based assay using the larvae of *Xenopus laevis* and *Ambystoma mexicanum*. *Ecotoxicol. Environ. Safe*. **55(1)**, 38-45.
- Sancho, E., Ferrando, M. D. and Andreu, E. (1997). Inhibition of Gill Na⁺,K⁺-ATPase Activity in the Eel, *Anguilla anguilla*, by Fenitrothion. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **38**, 132–136.
- Sancho, E., Fernandez-Vega, C., Ferrando, M.D. and Andreumoliner, E. (2003). Eel ATPase Activity as Biomarker of Thiobencarb Exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. **56**, 434–441.
- Santhoshkumar, P., Shivanandappa, T. (1999). In vitro sequestration of two organophosphorus homologs by the rat liver, *Chem. Biol. Interact*. **119(120)**, 277-282.
- Santos, T.G., Martinez C.B.R. (2012). Atrazine promotes biochemical changes and DNA damage in a Neotropical fish species. *Chemosphere*. **89**, 1118–1125.

- Saxena, T.B., Zachariassen, K.E., and Jorgensen, L. (2000). Effects of Ethoxyquin on the Blood Composition of Turbot, *Scophthalmus maximus* L. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. **127**,1–9.
- Sayım, F. (1998). *Malathion (Organik Fosforlu İsektisit)'un 25. evre Rana ridibunda (Amphibia:Anura) Larvaları Üzerindeki Akut Toksisitesi*. Doktora tezi, Ege Üniversitesi, İzmir.
- Schmidt, K., Staaks, G. B. O., Pflugmacher, S. and Steinberg, C. E. W. (2005). Impact of PCB mixture (Aroclor 1254) and TBT and a mixture both on swimming behavior, body growth and enzymatic biotransformation activities (GST) of young carp (*Cyprinus carpio*). *Aquat. Toxicol.* **71**, 49-59.
- Schmuck, R. (2001). Ecotoxicological profile of the insecticide thiacloprid. *Pflanzenschutznachrichten Bayer*. **54**, 161–184.
- Schulz-Jander, D.A., Leimkuehler, W.M., Casida, J.E. 2002. Neonicotinoid insecticides: reduction and cleavage of imidacloprid nitroimine substituent by liver microsomal and cytosolic enzymes. *Chem. Res. Toxicol.* **15**: 1158–1165.
- Serbes, D. (2011). *Cyfluthrin, imidacloprid ve karışım uygulamalarının Cyprinus carpio'da beyin ve karaciğer dokularında glutatyon, malondialdehit ve protein karbonil düzeylerine etkileri*. Yüksek lisans tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.
- Serrano, R., Simal-Julian, A., Pitarch, E., Hernandez, F., Varo, I., Navarro, J.C. (2004). Biomagnification study on organochlorine compounds in marine aquaculture. *Environ. Science Technology*. **38(4)**,1262–314.
- Sexton, S.E., Lei, Z. and Zilberman, D. (2007). The Economics of Pesticides and Pest Control. *International Review of Environmental and Resource Economics*. **1**, 271-326.
- Shailaja, M. S. and D'Silva, C. (2003). Evaluation of impact of PAH on a tropical fish, *Oreochromis mossambicus* using multiple biomarkers. *Chemosphere*. **53(8)**, 835–841.
- Sies, H. (1997). Oxidative Stress: Oxidants and antioxidants. *Experitmental Physiology*. **82**, 291-295.
- Simkiss, K. and Taylor, M.G., (1989). Metal Fluxes Across the Membranes of Aquatic Organisms. Review. *Aquatic Sciences*. **1(1)**, 173-188.
- Singh, M., Sandhir, R., Kiran, R. (2006). Erythrocyte antioxidant enzymes in toxicological evaluation of commonly used organophosphate pesticides. *Ind. Exp. Biol.* **44**, 580–583.
- Singh, R. K. and Sharma, B. (1998). Carbafulan-induced biochemical changes in *Clarias batrachus*. *Pestic. Sci.* **53**, 285-290.
- Skouras, A., Lang, T., Vobach, M., Danischewski, D., Wosniok, W., Scharsack, J. P. and Steinhagen, D. (2003). Assessment of some innate immune responses in dab (*Limanda limanda* L.) from the North Sea as part of an integrated biological effects monitoring. *Helgoland Mar. Res.* **57(3-4)**,181-189.

- Soreq, H. and Seidman, S., (2001), Acetylcholinesterase - new roles for an old actor. *Nat. Rev. Neurosci.* **2**, 294-302.
- Srivastava, A. S., Oohara, L., Suzuki T. and Singh, S. N. (1990). Activity and expression of aspartate aminotransferase during the reproductive cycle of a fresh water fish, *Clarias batrachus*. *Fish Physiol. Biochem.* **20**, 243-250.
- Stagg, R., Goksoyr, A. and Rodger, G. (1992). Changes in Branchial Na⁺,K⁺-ATPase, Metallothionein and P450 1A1 in Dab *Limanda limanda* in the German Bight: Indicators of Sediment Contamination? *Marine Ecology Progress Research.* **91**, 105-115.
- Stagg, R.M. and Canlı, M. (1996). The Effects of In vivo Exposure to Cadmium, Copper, and Zinc on the Activities of Gill ATPases in the Norway Lobster *Nephrops norvegicus*. *Archive of Environmental Contamination and Toxicology.* **31**, 491–501.
- Stephensen, E., Svavarsson, J., Sturve, J., Ericson, G., Adolfsson-Erici, M., Förlin, L. (2000). Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquatic Toxicology.* **48**, 431–442.
- Stephensen, E., Sturve J. and Förlin, L. (2002). Effects of redox cycling compounds on glutathione content and activity of glutathione-related enzymes in rainbow trout liver. *Comp. Biochem. Physiol. C, Toxicol. Pharmacol.* **133(3)**, 435-442.
- Şanlı, Y. (1984). Çevre Sorunları ve Besin Kirlenmesi. *S.Ü. Veteriner Fakültesi Dergisi.* **2**, 17-37.
- Tavera-Mendoza, L., Ruby, S., Brousseau, P., Fournier, M., Cyr, D., Marcogliese, D. (2002). Response of the amphibian tadpole (*Xenopus laevis*) to atrazine during sexual differentiation of the testis. *Environ Toxicol Chem.* **21(3)**, 527-531.
- Terada, T. (2005). Role of glutathione S-transferase in lens under oxidative stress. *J. Health Sci.* **51**, 263–271.
- Thaker, J., Chhaya, J., Nuzhat, S., Mittal, R., Mansuri, A.P. and Kundu, R. (1996). Effects of Chromium (VI) on Some Ion-dependent ATPases in Gills, Kidney and Intestine of a Coastal Teleost *Periophthalmus dipes*. *Toxicology.* **112**, 237–244.
- Thomas, P. And Wofford, H.W. (1993). Effects of cadmium and Aroclor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues. *Aquatic Toxicology.* **27(1:2)**, 159-177.
- Thompson, H. M. (1999). Esterases as markers of exposure to organophosphates and carbamates. *Ecotoxicology.* **8**, 369–384.
- Tiryaki, O. And Temur, C. (2010). The Fate of Pesticide in the Environment. *J. Biol. Environ. Sci.* **4(10)**, 29-38.
- Tišler, T., Jemec, A., Mozetič, B., Trebše, P. (2009). Hazard identification of imidacloprid to aquatic environment. *Chemosphere.* **76**, 907–14.

- Tomizawa, M. And Casida, J. E. (1999). Minor structural changes in nicotinoid insecticides confer differential subtype selectivity for mammalian nicotinic acetylcholine receptors. *British Journal of Pharmacology*. **127**, 115-122.
- Tomizawa M. and Casida J.E. (2000). Imidacloprid, thiacloprid, and their imine derivatives up-regulate the $\alpha 4\beta 2$ nicotinic acetylcholine receptor in M10 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **169**, 114-120.
- Tomizawa, M., Cowan, A., Casida, J.E. (2001a). Analgesic and toxic effects of neonicotinoid insecticides in mice. *Toxicology and Applied Pharmacology*. **177**, 77-83.
- Tomizawa, M. and Casida, J.E. (2001b), Structure and diversity of insect nicotinic acetylcholine receptors. *Pest Manag Sci*. **57**, 914-922.
- Tomizawa, M. and Casida, J.E. (2003). Selective Toxicity of Neonicotinoids Attributable to Specificity of Insect and Mammalian Nicotinic Receptors. *Annu. Rev. Entomol*. **48**, 339-364.
- Tomizawa, M. (2004). Neonicotinoids and derivatives: effects in mammalian cells and mice. *Journal of Pesticides Science*. **29(3)**,177-183.
- Tomizawa M.and Casida J.E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Reviews in Pharmacology and Toxicology*. **45**, 247-268.
- Tosun, N., Karabay, N.U. and Sayım, F. (2001). Pesticide Usage and their Potential Adverse Impacts on Living Organism. *ANADOLU, Journal of Aegean Agricultural Research Institute*. **11(1)**, 113-125.
- Townsend, D.M., Tew, K.D. (2003). The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*. **22**, 7369-7375.
- Uçkun, A.A. (2011). *Karakaya Baraj Gölü'nde Kafes Balıkçılığının Su Kalitesi ve Bazı Balık Populasyonlarının Biyolojik Parametreleri Üzerine Etkileri*. Doktora tezi, İnönü Üniversitesi, Malatya.
- Ueda, K. (1971). Environmental pollution due to pesticides, *Asian Med. J*. **14**, 603-615.
- Üner, N., Oruç, E., Sevgiler, Y. (2005). Oxidative stress-related and ATPase effects of etoxazole in different tissues of *Oreochromis niloticus*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **20(1)**, 99-106.
- Vaglio, A. and Landriscina, C. (1999). Changes in liver enzyme activity in the teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication. *Ecotoxicol. Environ. Saf*. **43**, 111-116.
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullou, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotox. Environ. Safety*. **64(6)**, 178-189.

- Vale, J. A. (1998). Toxicokinetic and Toxicodynamic Aspects of Organophosphorus (OP) Insecticide Poisoning. *Toxicology Letters*. **102-103**, 649-652.
- Van der Oost, R., Beyer, J., & Vermeulen, N. P. E. (2003). Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. **13**, 57–149.
- Vieira, L. R, Sousa, A., Frasco, M. F., Lima, I., Morgado, F., Guilhermino, L. (2008). Acute effects of Benzo[a]pyrene, anthracene and a fuel oil on biomarkers of the common goby *Pomatoschistus microps* (Teleostei, Gobiidae). *Science Of The Total Environment*. **395**, 87-100.
- Vo D.T., Hsu W.H., Abu-Basha E.A., Martin R. (2010). Insect nicotinic acetylcholine receptor agonists as flea adulticides in small animals. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. **33**, 315-322.
- Vural N. (2005). *Toksikoloji*. Ankara Üniversitesi Basımevi, Ankara, Türkiye. 344-379 pp.
- Watanabe E. (2012). Review on Current Analytical Methods with Chromatographic and Nonchromatographic Techniques for New Generation Insecticide Neonicotinoids (pp: 481-511). *Insecticides-Advances in Integrated Pest Management*. Chapter 2, InTech opens cience/ open minds. Croatia.
- Watson, T.A. and Beamish, F.W.H. (1980). Effects of Zinc on Branchial ATPase activity *in vivo* in Rainbow Trout, *Salmo gairdneri*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*. **66**, 77-82.
- Webb, D., Gagnon, M. M. and Rose, T. (2005). Metabolic enzyme activities in black bream (*Acanthopagrus butcheri*) from the Swan-Canning Estuary, Western Australia. *Comp. Biochem. Physiol. C, Toxicol. Pharmacol.* **141(4)**, 356-365.
- Wheelock, C. E., Shan, G. and Ottea, J. (2005). Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. *J. Pestic. Sci.* **30**, 75–83.
- Wheelock, C.E., Phillips, B.M., Anderson, B.S., Miller, J.L., Miller, M.J., Hammock, B.D. (2008). Applications of carboxylesterase activity in environmental monitoring and toxicity identification evaluations (TIEs). *Rev Environ Contam Toxicol.* **195**, 117-78.
- WHO International Programme on Chemical Safety (IPCS). (1993). *Biomarkers and risk assessment: concepts and principles*. *Environmental Health Criteria 155*, World Health Organization, Geneva, 82 p.
- Wogram, J., Sturm, A., Segner, H. and Liess, M. (2001). Effects of parathion on acetylcholinesterase, butyrylcholinesterase, and carboxylesterase in threespined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) following short-term exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* **20**, 1528–1531.
- Wong, C.K.C. and Wong, M.H. (2000). Morphological and Biochemical Changes in the Gills of Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) to Ambient Cadmium Exposure. *Aquatic Toxicology*. **48**, 517–527.

- Woodwell, G.M. (1967). The toxic substances and ecological cycles. *Sci. Am.* **216**, 24-31.
- Xing, H., Li, S., Wang, Z., Gao, X., Xu, S., Wang, X. (2012). Oxidative stress response and histopathological changes due to atrazine and chlorpyrifos exposure in common carp. *Pesticide Biochemistry and Physiology.* **103**, 74–80.
- Xuereb, B., Lefevre, E., Garric, J., Geffard, O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquat. Toxicol.* **94**, 114–122.
- Yamamoto, I. and Casida, J.E. (1999). *Nicotinoid insecticides and the nicotinic acetylcholine receptor*. Springer-Verlag, Tokyo, Japan.
- Yıldız, M., Gürkan, M. O., Turgut, C., Kaya, Ü., Ünal, G. (2005). Tarımsal savaşımında kullanılan pestisitlerin yol açtığı çevre sorunları (pp: 649-668). *TMMOB Ziraat Mühendisleri 6. Teknik Kongresi*, 3-7 Ocak, Ankara.
- Yüksek, T. (2004). Türkiye'nin su kaynakları ve havza planlamasına dönük genel değerlendirmeler. *Kafkas Üniversitesi Artvin Orman Fakültesi Dergisi.* **1(2)**, 71-83.
- Zaahkook, S. A. M., Helal, E. G. E, Fahmy, N., AL-Shinnawy, M. A. A., and B. Abd-EL-Ghany. (2009). Physiological Study About Imidacloprid Toxicity And The Role Of Vitamin" C" As A Protective Agent On Japanese Quails. *The Egyptian Journal of Hospital Medicine.* **34**, 183-197.
- Zhang, J., Shen, H., Wang, X., J. Wu and Xue, Y. (2004). Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus*. *Chemosphere.* **55**, 167–174.
- Zhang, J., Wang, Y., Xiang, H., Li, M., Li, W., Ma, K., Wang, X., Zhang, J. (2011). Oxidative stress: role in acetamiprid-induced impairment of the male mice reproductive system. *Agricultural Sciences in China.* **10(5)**, 786-796.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : : Miraç UÇKUN
Doğum Yeri ve Tarihi : Malatya - 20.06.1979
Adres : Çöşnük Mah. Aytaç Paşa Cad. Taşıyıcılar Sitesi
A-Blok Kat: 2 No: 42/8 44330 MALATYA
E-mail : : mirac.uckun@inonu.edu.tr
Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji
Bölümü, Malatya (1999-2003)
Yüksek Lisans : İnönü Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji
Anabilim Dalı, Malatya (2003-2006)
Mesleki Deneyim : Araştırma Görevlisi (2007-.....)
Yayın Listesi :

1. H. Geckil, S. Gencer, **M. Uckun**, *Vitreoscilla* hemoglobin expressing *Enterobacter aerogenes* and *Pseudomonas aeruginosa* respond differently to carbon catabolite and oxygen repression for production of L-asparaginase, an enzyme used in cancer therapy, **Enzyme And Microbial Technology**, 35 (2004) 182-189.
2. H. Geckil, B. Ateş, S. Gencer, **M. Uckun**, I. Yılmaz, Membrane permeabilization of gram-negative bacteria with a potassium phosphate/hexane aqueous phase system for the release of L-asparaginase: an enzyme used in cancer therapy, **Process Biochemistry**, 40 (2005) 573-579.
3. H. Geckil, S. Gencer, B. Ateş, U. Ozer, **M. Uckun**, I. Yılmaz, Effect of *Vitreoscilla* hemoglobin on production of a chemotherapeutic enzyme, L-asparaginase, by *Pseudomonas aeruginosa*, **Biotechnology Journal**, 1 (2006) 203-208.
4. A. Güngördü, M. Uçkun, (2013). Comparative assessment of *in vitro* and *in vivo* toxicity of azinphos methyl and its commercial formulation. (Submitted).

Tezden Türetilen Sunumlar : THİACLOPRİD VE TRİFLOXYSTROBİN'İN *XENOPUS LAEVIS*'DE AKUT TOKSİK ETKİLERİ, 21. Ulusal Biyoloji Kongresi, 3-7 Eylül 2012, İzmir. (Poster Sunumu)